

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Clasificación histopatológica de tipos de linfoma canino en el laboratorio de histología, embriología, y patología veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Periodo 1996-2012

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Víctor Humberto Puicón Niño de Guzmán

Lima – Perú

2013

DEDICATORIA

A Allah por demostrarme su amor en traerme a este mundo, al brindarme a la familia maravillosa que tengo, a la profesión que me dio como vocación, y a los verdaderos amigos y hermanos que siempre estuvieron allí.

A mis padres Humberto y Claudia, los mejores del universo, por su inmenso cariño y dedicación, hace 24 años tuve la verdadera dicha de conocerlos y aprender mucho de ustedes, gracias por su confianza y apoyo, gracias por creer siempre en mí.

A mi abuela Blanca, por apoyarme en todos estos años, por su inmenso cariño y fé total en mí.

A mi bisabuela Herminia, mis abuelos Víctor y Agustina, por su apoyo y cuidado desde el cielo.

A mis hermanos Blanca y Roberto, que aunque no hayamos compartido mucho tiempo juntos, sé de su incalculable cariño y buenos deseos, hermano tú también lo lograrás.

A mi tío MV. Francisco Lorenzo Puicón, agradeciéndole su apoyo y comunicación constante en estos años, eres un ejemplo a seguir en la medicina veterinaria.

A mi sobrina Sofía, quién espero que siga de esta noble profesión, y a mi sobrino que está en camino y que lo esperamos con muchas.

A mi tía MV. Sonia Cortez, por ser ejemplo a seguir, orgullo de mi facultad, y del Perú.

A mi asesora MV. Nieves Sandoval Chaupe, por su inmensa amistad, cariño, esfuerzo y dedicación para que se realice la presente tesis, por toda su fé y confianza en el transcurso de este tiempo y por sus ánimos que siempre fueron oportunos.

A la MV. Viviana Fernández, por su apoyo y sus recomendaciones idóneas para la sustentación.

A la señora Normita Aquino, por su todo su apoyo, colaboración y confianza.

A Diana Rosaly Sánchez, cuyo cariño y optimismo son base para continuar en mi vida, gracias por tu apoyo en estos años...unas láminas histopatológicas nos unió y hasta hoy en día compartimos momentos de esperanza y ánimos, sé que lo lograremos juntos.

A Silvana Alva, por su sincera amistad y confianza, y ser mi eterna hermana que está en los momentos tristes como alegres de mi vida.

A Mabel Soto por su amistad y su hermandad en aquellos momentos un poco difíciles de resolver.

A Raquel Watanabe, por su valorable aporte en el día de la sustentación, sus ánimos, confianza y apoyo en todo momento.

A mis mascotas Niñita, Chiquita, Dolly, Shivelyto, Dixie Damián y C.C. por ser inspiración para ingresar a esta hermosa profesión.

y finalmente a todas mis demás amigas, amigos y hermanos en la fé, que son muchos y espero que no se sientan mal u ofendan por no haberlos incluido; mi agradecimiento también va para ustedes, por tenerme en cuenta como un amigo y profesional en quien confiar.

AGRADECIMIENTOS

A los docentes del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, MV. Luis Tabacchi Navarrete, MV. Rosa Perales Camacho, MV. Alfonso Chavera Castillo y MV. Gilberto Santillán Altamirano por su apoyo y orientación para la realización de la presente tesis.

Al MV. Danilo Gouveia Wasques, por su valorable aporte y gentileza para llevar acabo el presente estudio.

A mis revisores de tesis, MV. Ysaac Chipayo y MV. Jacqueline Cahua por guiarme y esclarecerme puntos relevantes en la tesis.

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos del Perú por brindarme todos estos años de estudios y forjarme como un Médico Veterinario comprometido con su profesión.

INDÍCE

INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE ANEXO.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	ix
I.INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Definición.....	3
2.2. Etiología	6
2.2.1. Factores involucrados en la etiología del linfoma canino	6
2.2.1.1. Predisposición genética.....	6
2.2.1.2. Aberraciones cromosómicas.	7
2.2.1.3. Exposición a químicos	8
2.2.1.4. Campos electromagnéticos.....	10
2.2.1.5. Factores inmunológicos	10
2.2.1.6. Factores infecciosos	11
2.3. Epidemiología	11
2.4. Clasificación del Linfoma Canino	13
2.4.1. Clasificación Anatómica	13
2.4.1.1. Linfoma multicéntrico.....	14
2.4.1.2. Linfoma intestinal	14
2.4.1.3. Linfoma mediastinico.....	15
2.4.1.4. Linfoma cutáneo	15
2.4.1.5. Linfoma extranodal	15
2.4.2. Clasificación histológica del linfoma canino	16
2.4.2.1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud	16
2.5. Presentación Clínica.....	24
2.6. Síndromes paraneoplásicos	28
2.7. Comportamiento biológico.....	32
2.8. Diagnóstico	32
2.8.1. Diagnóstico Clínico.....	33
2.8.1.1. Anamnesis.....	33
2.8.1.2. Examen físico.....	34
2.8.2. Diagnóstico patológico.....	35
2.8.3. Diagnóstico citológico	37
2.8.4. Diagnóstico histopatológico.....	38
2.8.5. Diagnóstico Molecular	39
2.8.6. Inmunofenotipo	39
2.8.6.1. PCR del reacomodamiento del receptor antigénico (PARR)	41
2.8.6.2. Timidina quinasa (TK).....	42
2.8.7. Métodos de diagnóstico por imágenes: Ecografía – Radiografía – Tomografía Axial Computarizada – Resonancia Magnética	43
2.8.8. Evaluación de la médula ósea	45

2.9. Estadificación.....	45
2.9.1. Clasificación por estados TNM.....	47
2.10. Tratamiento	49
2.11. Pronóstico.....	51
2.11.1. Indicadores de pronóstico	51
3. MATERIALES Y METODOS	56
3.1. MATERIALES	56
3.1.1. Lugar de estudio:.....	56
3.1.2. Materiales.....	56
3.2. METODOLOGÍA	57
3.2.1. Tamaño muestral	57
3.2.2. Manejo de variables	57
3.2.2.1. Clasificación Histopatológica	57
3.2.2.2 Criterios de selección de la clasificación histopatológica de tipos de linfoma canino de acuerdo a la OMS.....	57
3.2.2.3. Consideraciones generales incluidas.-.....	62
3.3. ANALISIS DE DATOS	63
4.RESULTADOS.....	64
5.DISCUSION	73
6.CONCLUSIONES	79
7.RECOMENDACIONES	80
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9.ANEXOS.....	96

INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 01 Cambios moleculares en las neoplasias de caninos y felinos.....	7
CUADRO N°02 Estadificación clínica de la Organización Mundial de la Salud para linfoma.....	46
CUADRO N° 03 Sistema de clasificación TNM propuesto para los tumores cutáneos de linfomas.....	48
CUADRO N° 04 Factores pronóstico para el Linfoma en caninos.....	53
CUADRO N° 05 Clasificación Histopatológica de tipos de Linfoma Canino-Patrón Nodular.	60
CUADRO N° 06 Clasificación Histopatológica de tipos de Linfoma Canino- Patrón difuso...	61
CUADRO N°07 Clasificación de tipos de linfoma canino. LHEPV-FMV-UNMSM. Período 1996 – 2012.....	71
CUADRO N°08 Datos de raza, edad, sexo y localización para cada tipo de linfoma canino. LHEPV-FMV-UNMSM. Período 1996 – 2012.....	72

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 01: Incidencia de los principales tumores en caninos (por 100 000 perros / año)....	12
Figura N° 02: Linfoma según la distribución anatómica.....	16
Figura N° 03: Labrador con signos de emaciación, anorexia, depresión y fiebre.....	23
Figura N° 04: Canino con nódulos linfáticos preescapulares aumentados de tamaño.....	24
Figura N° 05: Zonas y capas del folículo linfoide y su origen neoplásico.....	25
Figura N° 06: Síndrome paraneoplásico: Mucosas pálidas en un canino con linfoma.....	29
Figura N° 07: Linfoma esplénico. (Macroscópico).....	35
Figura N° 08: Linfoma craneomediastinal (Placa radiográfica).....	43
Figura N° 09: Linfoma de células B grande difuso inmunoblástico 400x.....	65
Figura N° 10: Linfoma de células B grande difuso Centroblástico 400x.....	65
Figura N° 11: Linfoma de células B grande difuso rico en células T 400x.....	66
Figura N° 12: Linfoma de células del Manto (Patrón tisular) 100x.....	66
Figura N° 13: Linfoma de células del Manto 400x	67
Figura N° 14: Linfoma linfoblástico 1000x	67
Figura N° 15: Linfoma periférico de células T inespecífico cutáneo no epiteliotrópico.....	68
Figura N° 16: Linfoma de células T micosis fungoides 100x	68
Figura N° 17: Linfoma de células T micosis fungoides 400x	69
Figura N° 18: Linfoma anaplásico de células grandes 1000x	69
Figura N° 19: Linfoma anaplásico de células grandes 1000x	70

INDICE DE ANEXO

Anexo 1. Casos de linfoma canino con diagnóstico histopatológico en el LHEPV- FMV- UNMSM Período 1996 – 2012.....	96
Anexo 2. Frecuencia del linfoma canino para el periodo 1996–2012. LHEPV -FMV-UNMSM Período 1996 – 2012.....	99
Anexo 3. Linfoma canino distribuido según la edad LHEPV-FMV-UNMSM. Período 1996 – 2012.....	100
Anexo 4. Linfoma canino distribuido según el sexo. LHEPV-FMV-UNMSM. Período 1996 – 2012 Período 1996 – 2012.....	101
Anexo 5. Linfoma canino distribuido según la raza LHEPV--FMV-UNMSM. Período 1996- 2012 Período 1996 – 2012.....	102
Anexo 6. Linfoma canino distribuido según los tipos de raza pura LHEPV- FMV- UNMSM. Período 1996 – 2012.....	103
Anexo 7. Localización del linfoma de los casos diagnosticados de linfoma canino del LHEPV – FMV – UNMSM Período 1996 – 2012.....	104
Anexo 8. Localización del linfoma de los casos diagnosticados por histopatología del LHEPV – FMV –UNMSM Período 1996 – 2012.....	105
Anexo 9. Localización del linfoma de los casos diagnosticados por citología del LHEPV – FMV – UNMSM Período 1996 – 2012.....	106

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo emplear los criterios actuales de la Clasificación Histopatológica del linfoma canino de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los casos diagnosticados como linfoma en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LHEPV – FMV - UNMSM), analizándose 1778 informes con diagnóstico histopatológico de neoplasias caninas del periodo comprendido entre Enero del 1996 a Diciembre del 2012. Se clasificó 16 de casos hallados con diagnóstico histopatológico de linfoma canino, de un total de 1778 informes histopatológicos con diagnóstico de neoplasia en caninos. De 16 casos evaluados se sugirieron los tipos: Linfoma de células B grande difuso (7/16) (43.75%), (subtipo inmunoblástico (4/16) (25%), subtipo centroblástico (2/16) (12.50%), subtipo Rico en células T (1/16) (6.25%)), linfoma de células del Manto (3/16) (18.75%), linfoma periférico de células T inespecífico (2/16) (12.50%), linfoma linfoblástico (2/16) (12.50%), linfoma T anaplásico de células grandes (1/16) (6.25%) y linfoma de células T – Micosis fungoides (1/16) (6.25%).

Palabras clave: Linfoma, neoplasia, Clasificación, canino

ABSTRACT

The aim of this study was to use the actual criteria of canine lymphoma histopathologic classification from the World Health Organization (WHO) in all diagnosed cases in the Laboratory of Histology, Embriology and Veterinary Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine from San Marcos University. 1778 reports of canine neoplasms diagnosed by histopathology since January 1996 to December 2012 were analyzed. 16 canine lymphoma cases were classified by histopathology, suggesting the following neoplasms: diffuse large B cell lymphoma (7/16) (43.75%), (immunoblastic subtype (4/16) (25%), centroblastic subtype (2/16) (12.50%), Rico subtype T cells (1/16) (6.25%), mantle cell lymphoma (3/16) (18.75%), peripheral T-cell lymphoma unspecified (2/16) (12.50%), lymphoblastic lymphoma (2/16) (12.50%), T cell lymphoma anaplastic large cell (1/16) (6.25%) and T-cell lymphoma - Mycosis fungoides (1/16) (6.25%).

Keywords: lymphoma, neoplasia, classification, canine

I. INTRODUCCIÓN

El linfoma maligno abarca un diverso grupo de patologías que envuelven al tejido linfático no incluyendo como origen a la médula ósea (Donald, 2007). El linfoma es definido como una proliferación de células linfoides malignas que primariamente surgen de linfonódulos u órganos viscerales sólidos, como el hígado o bazo (Romani *et al.*, 2004), esta es considerada como una enfermedad severa, progresiva y fatal, siendo su primera descripción hecha por Siedomgiotsky en 1872 (Couto, 1985).

Esta neoplasia ocurre en caninos de edad media o mayores (6-12 años de edad), sin predilección sexual (Vail y Ogilvie, 2003). Constituye entre el 7 - 24% de las neoplasia en caninos (Gear, 2009) y 83% de todas las neoplasia malignas hematopoyéticas, siendo la más común de las alteraciones linfoproliferativas en pequeños animales (Vail y Ogilvie, 2003).

La clasificación del linfoma puede ser descrita en base a la localización anatómica y por medio de criterios histológicos (Couto, 2001). El presente estudio se basará en la aplicación de los criterios histológicos de la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (2002), la cual

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definición

El linfoma maligno, linfoma o linfoma es un grupo diverso de neoplasias que tienen en común origen en las células linfoides (Vail y Young, 2009). El linfoma se define como una proliferación clonal de células linfoides malignas que primariamente surgen de linfonódulos u órganos viscerales sólidos, como el hígado o bazo, sin embargo, pueden crecer en cualquier tejido corporal, es una neoplasia espontánea, natural y similar en presentación clínica, etiología y factores pronósticos al linfoma no Hodgkin (LNH) de los seres humanos (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Fournel-Fleury *et al.*, 1997; Meuten, 2002), además, el término linfoma abarca un grupo heterogéneo de tipos, los cuales varían entre especies e individuos (Madewell, 2002). Es de importancia comentar que los términos linfoma, linfoma maligno o linfoma se usan indistintamente, aunque el termino linfoma que se usaba antiguamente para describir algunos linfomas difusos, ha caído en desuso en medicina humana por no permitir describir otros tipos especiales de linfoma (Trigo, 1998).

El origen extraganglionar del linfoma canino, se asocia a la proliferación maligna del tejido linfoide asociado a mucosas, como las que se encuentran en el sistema digestivo, pulmón, piel y bazo; su diseminación afecta el tejido linfoides y otros tejidos (Vail y Young, 2009). En tanto, la leucemia se define como una enfermedad neoplásica maligna de los precursores linfocíticos o hematíes, con células neoplásicas en la sangre periférica y en médula ósea. Sin embargo, Chevielle (1994) y McGavin (1988), indican que cuando las células del linfoma se diseminan en el torrente

sanguíneo se le denomina leucemia linfoide, en tanto, algunos animales que desarrollan grandes masas tumorales no se vuelven leucémicos y otros tumores linfoides son leucémicos incluso aunque no se encuentren lesiones sólidas. Los factores responsables de esta diseminación periférica aún son desconocidos (Valli, 2007).

Una difícil distinción descriptiva y diagnóstica entre la leucemia y linfoma fue resuelto en gran medida por el sistema de clasificación REAL / OMS, esta distinción se basa ahora en la vinculación de la nomenclatura del tejido con el mayor volumen de tumor. Conforme a este sistema, si la neoplasia se encuentra en la médula ósea se denomina leucemia, y si se encuentra en tejidos periféricos se denomina linfoma. De igual importancia es reconocer que los tumores de un tipo similar de célula pueden ocurrir como leucemia o linfoma, y en ese contexto son diferentes manifestaciones de la misma enfermedad, además, en los linfomas hay células neoplásicas siempre en circulación, y la probabilidad de diseminación a distancia es una función de la adherencia intercelular molecular citoplasmática (ICAM) que determinan si los linfocitos pueden adherirse, y extravasarse para su salida. (Valli, 2007).

Por lo tanto, las leucemias agudas no tienen la mayoría de sitios de adhesión y tienden a permanecer en circulación. En el otro extremo del espectro de la adhesión, los linfomas tipo MALT pueden estar fuertemente adheridos a un solo lugar que pueden ser curables mediante la extirpación quirúrgica (Valli, 2007).

Una distinción general válida es que la malignidad en un linfocito indiferenciado es probable que ocurra en la médula de un joven individuo presentándose como leucemia, pero si la neoplasia ocurre en un linfocito maduro, es probable que ocurra en los tejidos periféricos de un individuo adulto y se presentan como linfoma (Valli, 2007), con excepciones habituales a las presentaciones de ocurrencia más común, como se ve en linfomas de células T $\gamma\delta$ de humanos, perros, y gatos, que surgen en el intestino, implicando el bazo y padecen leucemia, pero sin la participación abierta de la médula. Por lo tanto, la definición de leucemia necesita estar ampliada para incluir a un nivel notable de la circulación linfocitos neoplásicos que surgen en la periferia, la distinción de qué si se trata de médula cuando las células neoplásicas están en circulación es siempre una determinación importante para los propósitos de gestión clínica (Valli, 2007).

El término de linfosarcoma (1863) fue inicialmente empleado por Rudolf Virchow, sin embargo, posteriormente, Teodoro Billroth, utilizó el término "linfoma maligno"(1871), en 1832, Sir Thomas Hodgkin, describe un síndrome caracterizado por el desarrollo de las adenopatías (Enfermedad de Hodgkin), siendo a finales del siglo XIX y en a inicios del siglo

XX donde se hicieron varios intentos de identificar el origen celular de estas neoplasias, considerándose que se originan a partir del denominado sistema retículo-endotelial, descrito por Ashoff en 1924. Esta es la razón por la cual más términos se propusieron para la denominación del linfoma, tales como “*Reticulosarcome*” (Oberling, 1928), *retothelsarkom* (Roulet, 1930), reticulosis o reticulosarcoma (Robb-Smith, 1938) y linfoma histiocítico (Rappaport, 1966). Los conceptos de esta neoplasia en esos años era debido a que se creía que una sola célula mesenquimal indiferenciada podría dar lugar al origen de las células sanguíneas y a las células del tejido conectivo (Laurent, 2001). Sin embargo, las neoplasias linfoides son un grupo heterogéneo de tipos, con diversas morfologías, expresiones clínicas, con pronóstico y tratamiento variable (Valli, 2010). Por estas razones, tanto en oncología humana y veterinaria se han realizado, varios intentos de establecer una clasificación racional de esta estirpe de tumores (Laurent, 2001).

Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, hay dos grupos principales de linfoma: el linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin (Vela Casas, 2004). En el linfoma de Hodgkin el parénquima tumoral está constituido por dos tipos de células de origen linfoide: las células de Hodgkin y las células de Reed-Sternberg. Las células de Hodgkin, se caracterizan por ser grandes (alrededor de 20 micrones), con citoplasma relativamente abundante, núcleo grande vesiculoso, redondeado o irregular, membrana nuclear gruesa por marginación de cromatina y nucléolo prominente (Robins, 2009), en tanto, las células de Reed-Sternberg, son más grandes que las mencionadas anteriormente, muy prominentes, gigantes (mayores de 50 micrones) con citoplasma abundante, se caracterizan por poseer dos núcleos grandes, vesiculosos, con membrana nuclear gruesa, cada uno tiene un nucléolo prominente; los nucléolos están ubicados en una misma línea en un área vecina de ambos núcleos. Para confirmar el diagnóstico de enfermedad de Hodgkin es necesario evidenciar las células de Reed-Sternberg (González y Chuaqui, 2010).

En el linfoma no-Hodgkin, el tejido tumoral está constituido casi exclusivamente por las células neoplásicas; el estroma es muy escaso (Robins, 2009), en cada linfoma hay un solo tipo de célula tumoral, la que corresponde a alguna etapa de diferenciación de las células linfoides. Sin embargo, estas células malignas no expresan por completo el fenotipo normal y suele haber diferencias en la distribución de los antígenos de diferenciación que caracterizan a cada tipo de célula linfoide normal (González y Chuaqui, 2010).

2.2. Etiología

El linfoma es una enfermedad multifactorial sin un agente etiológico único definido; sin embargo, se postulan algunos factores como predisposición genética, aberraciones cromosómicas, exposición a químicos, radiación o campos electromagnéticos; la infección viral no ha sido bien documentada en esta especie (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Kelsey *et al.*, 1998; Meuten, 2002). Para algunas especies como gatos, gallinas, bovinos y seres humanos, se ha demostrado una etiología para determinadas formas de linfoma. En el caso del gato, existen evidencias directas de un linfoma inducido por el virus de la leucemia felina (FeLV), así como evidencias indirectas, de un linfoma inducido por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) (Vail y Ogilvie, 2003).

Vail e Ogilvie (2003) mencionan, que puede existir una predisposición genética para el desenvolvimiento de determinadas formas de linfoma, ya que la prevalencia de esta neoplasia es elevada en determinadas líneas sanguíneas, y que la exposición a carcinógenos químicos, físicos y virales puede ejercer un papel en el desenvolvimiento de muchos tipos tumorales.

2.2.1. Factores involucrados en la etiología del linfoma canino

2.2.1.1. Predisposición genética

La reciente publicación del genoma canino y la disponibilidad comercial de microensayos genéticos caninos (p. ej. Genechip Canine Genome 2.0 array; Affymetrix Santa Clara, California) llevarán con certeza a avances al conocimiento de los eventos genéticos en el linfoma en un futuro muy cercano (Lindblad *et al.*, 2005).

Varias predisposiciones genéticas han sido descritas para un pedigree de Bull Mastiff (Onions, 1984), una familia de Rottweilers, una pareja de cría de Scottish Terriers sin parentesco (Teske *et al.*, 1985). La línea germinal y la mutación somática genética en el gen supresor tumoral p53 y el gen N – ras (Cuadro 1) han sido documentados en la raza Bull Mastiff y en un perro con linfoma respectivamente (Veldhoen *et al.*, 1998; Mayr *et al.*, 2003). Así mismo, se ha informado mayor incidencia de presentación en ciertas razas puras como Boxer, San Bernardo, Terrier Escocés, Basset Hound, Airedale Terrier, Bulldog Inglés, Chow Chow, Pastor Alemán, Cocker Spaniel, Poodle, Rottweiler, mientras que hay menor

incidencia en otras razas como Dachshund y Pomerania (Álvarez *et al.*, 2009; Baskin *et al.*, 2000; Meuten, 2002; Morrison, 1998; Sueiro *et al.*, 2005).

Además, las diferencias en la prevalencia de los tipos inmunofenotípicos del linfoma entre diferentes razas han sido demostrados para indicar los riesgos heredables (Modiano *et al.*, 2005; Lurie *et al.*, 2004). Las modificaciones epigenéticas también han sido investigadas en perros con linfoma; La hipometilización del ácido desoxirribonucleico (ADN) fue una característica de las células neoplásicas en la mayoría de los casos de linfoma y en una tercera parte de los casos de leucemia investigados y probablemente está inmerso en la transformación maligna de las células linfoides (Pelham *et al.*, 2003).

CUADRO N° 01 Cambios moleculares en las neoplasias de caninos y felinos

Altered gene	Species	Tumour types	Reference
p53	Dog	Osteosarcoma Squamous cell carcinoma Nasal adenocarcinoma Peri-anal gland adenocarcinoma Mammary adenoma/carcinoma Lymphoma	Sagartz <i>et al.</i> 1996 Gamblin <i>et al.</i> 1997 Mayr <i>et al.</i> 1998a, 1999 Veldhoen <i>et al.</i> 1999 Nasir & Argyle 1999
p53	Cat	Mammary carcinoma Osteosarcoma Fibrosarcoma Spindle cell sarcoma Pleomorphic sarcoma	Mayr <i>et al.</i> 1998b, c
K-ras	Dog	Lung carcinoma	Kraegel <i>et al.</i> 1992
N-ras	Dog	Acute non-lymphocytic leukaemia	Gumerlock <i>et al.</i> 1989
yes-1	Dog	Mammary and other tumours	Miyoshi <i>et al.</i> 1991b Rungsipat <i>et al.</i> 1999
myc	Dog Cat	Plasma cell tumours Lymphoma	Frazier <i>et al.</i> 1993 Neil <i>et al.</i> 1984

Fuente: Morris y Dobson, 2002.

2.2.1.2. Aberraciones cromosómicas.

Recientes avances en citogenética molecular, incluyendo las técnicas de microensayos genéticos, han sido y están siendo habitualmente utilizadas en las investigaciones de las aberraciones cromosómicas en los perros con linfoma (Thomas *et al.*, 2001). Existen escasos estudios citogenéticos en el perro, debido a la dificultad para realizar el cariotipo que consta de 76 cromosomas acrocéntricos (Meuten, 2002). En los datos publicados, 25% de los casos que presentaron trisomía del cromosoma 13, se relacionaron con incremento en

la duración de la primera remisión y tiempo de supervivencia en comparación con aquellos perros con otras alteraciones cromosómicas (Vail y Young, 2009).

Otras trisomías reportadas son las de los cromosomas 20, 30 y 37, así como tetrasomía del cromosoma 9 (Winkler *et al.*, 2005). En un estudio por citometría de flujo sobre ploidias en linfoma canino, se encontró que más del 70% de los casos fueron diploides y cerca del 20 % aneuploides (Thomas *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2003). El grupo de Bree ha documentado además el incremento del cromosoma 31 y pérdida del cromosoma 14 como las aberraciones más comunes de un grupo de 25 casos analizados (Thomas *et al.*, 2003).

Las aberraciones cromosómicas no son aleatorias en el linfoma humano y algunas aberraciones sirven como marcadores de varios tipos de linfomas, además, varios oncogenes que quizás juegan un rol en la patogénesis del linfoma han sido detectados basándose en la identificación de las anormalidades citogenéticas (Yunis *et al.*, 1984; Whang-Peng, 1995). Las aberraciones cromosómicas también han sido descritas en el linfoma canino (Thomas *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 1995). Un estudio de 61 perros con linfoma demostraron una ventaja en el tratamiento con trisomía del cromosoma 13 (25% de los perros estudiados), puesto en evidencia por un incremento en la duración de la primera remisión y del tiempo general de supervivencia (Hahn *et al.*, 1995).

La expresión de un oncogén alterado/ gen supresor tumoral, los cambios epigenéticos, señal de transducción y alteración en las rutas de muerte son comunes en los linfomas humanos y probablemente también están involucradas en el perro. la actividad telomerasa también ha sido documentada en los tejidos caninos con linfoma (Nasir *et al.*, 2001; Yazawa *et al.*, 2003). Alteraciones en las rutas de muerte celular, particularmente en la familia Bcl-2 de moléculas que gobiernan la proapoptosis y la antiapoptosis, han sido implicadas en el linfoma no Hodgkin humano y son actualmente e investigadas en el linfoma canino (Oltersdorf, 2005).

2.2.1.3. Exposición a químicos

Se ha sugerido que la exposición a algunos herbicidas particularmente el ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4 - D), incrementa el riesgo en los perros para padecer linfoma no Hodgkin (Weisenburger, 1994; Blair, 1990). Un estudio de control de población del linfoma no Hodgkin en granjeros de Kansas describió de dos a seis veces mayor, cuando el

propietario ha aplicado este herbicida más de cuatro veces al año en su propiedad. (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Álvarez *et al.*, 2009; Meuten, 2002).

Una publicación de un estudio de control indicó que los propietarios en casa con perros que desarrollaron linfoma maligno utilizaron herbicidas 2,4-D en el césped o fue tratado por compañías comerciales del cuidado de césped que trataron su jardín más frecuentemente que los propietarios de perros sin linfoma (Kaiser, 1981).

El riesgo del linfoma canino fue descrito con un incremento de dos veces (ratio de ventaja, 1,3) con cuatro o más aplicaciones por año de 2,4-D, los resultados de este estudio tienen conclusiones críticas y las investigaciones siguiendo un patrón de árbol no ha sido validado la afirmación del incremento del riesgo (Carlo *et al.*, 1992; Kaneene *et al.*, 1999).

En otro estudio, los perros expuestos al tratamiento de césped dentro de los 7 días tras su aplicación tuvieron más de 50 veces mayor probabilidad de tener niveles en orina en 2,4-D de 50 µg/L o mayor (Reynolds *et al.*, 1994). La mayor concentración fue detectada 2 días después de la aplicación, en un estudio de 28 perros con linfoma, los tumores de perros con exposición conocida al 2,4-D fueron analizadas usando tecnología PRC (polimerasa chain reaction) para las mutaciones del oncogen N-ras celular (Edward *et al.*, 1993). Los genes ras influyen la proliferación celular y pueden inducir la diferenciación por rutas de transducción de señales, la mutación de estos genes acaba en las proteínas ras que promueven el crecimiento celular. Un perro demostró una mutación de N- ras, indicativo de que esta mutación es poco frecuente en el linfoma canino, un hallazgo similar al de los humanos con linfoma (Kaiser *et al.*, 1981).

En un estudio de control de casos medioambientales desarrollado en Europa, con dos variables, residencia en áreas industriales y el uso de químicos (definidos como pintura y disolventes) por los propietarios, incrementó modestamente el riesgo de linfoma; sin embargo, no se obtuvo relación entre el uso de pesticidas y el riesgo (Gavazza *et al.*, 2001).

Existen datos confirmados por Madewell (2002), quién menciona estudios epidemiológicos que sugieren que la polución ambiental (exposición a tabaco, humo de tubos de escape, etc.) y los alimentos ricos en vísceras y harinas animales (que concentran hormonas, pesticidas, colorantes y preservantes artificiales); pueden ser factores que contribuyen a la aparición de cáncer en animales.

2.2.1.4. Campos electromagnéticos

Se observó una débil asociación entre linfoma en perros y la exposición a fuertes campos magnéticos en un estudio epidemiológico preliminar (Reif *et al.*, 1995). En un estudio de control de casos hospitalarios por categorías según tuvieran una exposición alta o muy alta tuvieron un riesgo incrementado de linfoma (ratio de ventaja, 1,8).

Los campos electromagnéticos de baja frecuencia (50-60 Hz) creados por corrientes eléctricas en los hogares, se han relacionado con el desarrollo de cáncer en niños, especialmente con leucemia (Kelsey *et al.*, 1998); así mismo, con enfermedades linfoides malignas en el adulto. Esta relación también se ha considerado como causa de incremento en el desarrollo de linfoma en el perro (Meuten, 2002, Sueiro *et al.*, 2005).

2.2.1.5. Factores inmunológicos

Existen algunos reportes (Dobson, 2001; Greenle, 1990, Meuten, 2002) que revelan una asociación entre el sistema inmune o autoinmunidad y neoplasias hematopoyéticas en perros. En 1992, Keller determinó que perros con trombocitopenia mediada por autoanticuerpos, tenían mayor incidencia de padecer linfoma que aquellos sin este padecimiento, independientemente de la edad o del sexo; además se tienen evidencia del papel del sistema inmune en el desarrollo del linfoma tras la observación de los pacientes humanos trasplantados. Los individuos con inmunosupresión tienen un mayor riesgo de cáncer linforreticular (Levine, 1994), y los pacientes con órganos trasplantado tienen una alta incidencia de linfoma no Hodgkin (Penn, 1990). Un caso de linfoma que desarrolló un perro después de un tratamiento con ciclosporina, aunque sólo es un caso, mantiene una comunicación con la terapia inmunosupresiva en las especies (Blackwood, 2004), así mismo, un perro desarrolló linfoma multicéntrico, siete meses después del diagnóstico de pénfigo cutáneo.

En forma experimental, se pudo inducir la enfermedad en perros recién nacidos mediante la inoculación de células linfomatosas (Graham *et al.*, 1993; Couto *et al.*, 1995). Estos factores de predisposición tienen consecuencias cuando las mascotas están deprimidas o débiles, tanto en el aspecto inmunitario, como físico (Ewen *et al.*, 1989; Laing *et al.*, 1989).

2.2.1.6. Factores infecciosos

La hipótesis de que un retrovirus puede estar involucrado en la patogénesis del linfoma canino no ha sido confirmada (Chapman *et al.*, 1967). Sin embargo, las partículas virales con propiedades similares a las de los retrovirus han sido identificadas en los cultivos de corta duración de los tejidos de linfoma canino (Strandstrom *et al.*, 1979).

Se ha realizado una asociación directa entre las infecciones con *Helicobacter* y el desarrollo de linfoma gástrico (Farinha *et al.*, 2005). Aunque eso no ha sido demostrado definitivamente en los perros, la evidencia indica que la infección de Beagles de laboratorio con *Helicobacter* acaba en la formación de folículos linfoides gástricos, los cuales son considerados como precursores del linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) en los humanos (Rossi *et al.*, 1999).

Últimamente, un agente etiológico ha sido implicado en la etiología del linfoma, el virus del Epstein Barr, este es un virus de la familia de los herpesvirus, siendo este agente la mayor causa de la mononucleosis aguda infecciosa, reportándose que más del 90% de los humanos presenta anticuerpos contra este agente viral. El virus ha sido asociado a Linfoma de Hodgkin, a Linfoma no Hodgkin y a linfoma de Burkitt en el humano, investigadores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pennsylvania tienen evidencias de que el virus de Epstein Barr puede ser responsable de causar linfoma en perros (Shih-Hung, 2012), para llegar a estos resultados, los investigadores tomaron muestras de sangre de 48 perros con linfoma y 41 perros sin linfoma, con el fin de evaluar el título de anticuerpos anti Epstein Barr, en este estudio observaron que 8 perros con linfoma y 3 perros sin linfoma tenían altos títulos de anticuerpos anti Epstein Barr, confirmando de esta manera la exposición al virus (Shih-Hung, 2012).

2.3. Epidemiología

El linfoma es una enfermedad relativamente común y dentro de los tumores hemolinfáticos representa el 80% de hemopatías malignas (Varela, 1999). El linfoma canino, es el tercer tipo de cáncer más frecuente en el perro y afecta aproximadamente del 7% al 24% de todas las neoplasias caninas y representa el 83% de las neoplasias hematopoyéticas (Vail y Young, 2009).

En un estudio realizado por Michel (1999) determinó una incidencia de 7.36% (114/1548) de linfoma canino (Fig. 1). Gear (2009) reporta que la incidencia anual es de 13 a 30 casos por cada 100,000 perros en riesgo.

La tasa de incidencia anual ha sido estimada en 1.5 % perros menores de 1 año y 84 % en un grupo de perros de 10 a 11 años de edad (Vail y Young., 2009). Aunque esta enfermedad es considerada como la tercera neoplasia de mayor importancia en el canino, en algunos lugares como el servicio de Oncología de la Universidad de Pensilvania, la colocan como la de mayor frecuencia. (Ann, 1994). Estudios realizados en humanos y en caninos han demostrado que la prevalencia de los distintos tipos de linfoma depende en gran medida de la región geográfica (Álvarez *et al.*, 2009; Guija de Arespacochaga *et al.*, 2007; Dhaliwal y Kitchell, 2003).

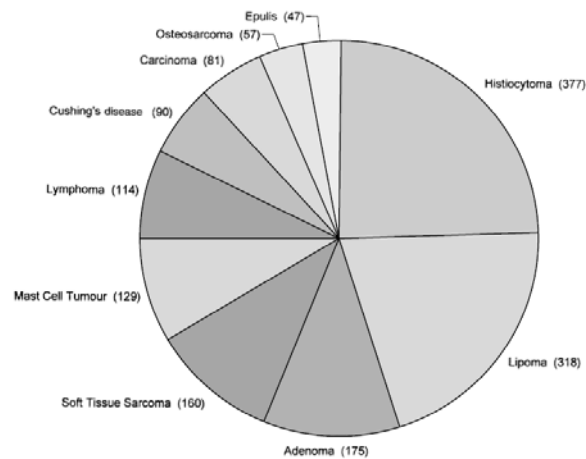


Figura 1. Incidencia de los principales tumores en caninos (por 100 000 perros / año).

En una revisión del programa de la VMDP (Veterinary Medical Data Base), basado en la Universidad de Purdue, en un periodo de 1987 a 1997, la frecuencia en la que se presentaron pacientes con linfoma canino en 20 clinicas veterinarias se incrementó del 0.75% del total de casos inscritos a un 2% y la frecuencia continua incrementándose. Una tendencia similar está presente en la oncología médica, el linfoma no Hodking suma el 5% de todos los nuevos cánceres; es la quinta causa de muerte por cáncer y el segundo en crecimiento rápido en términos de mortalidad en humano (Jemal *et al.*, 2004).

En cuanto a la edad, el linfoma es una enfermedad que se presenta en animales entre 5 a 11 años de edad, siendo el pico de incidencia entre los 5 a 6 años (Moulton, 1978), sin embargo, se

han reportado casos en animales menores de un año (Morris y Dobson, 2002). Cuando se presenta en animales jóvenes es más agresiva y de mal pronóstico, como es para el caso del linfoma histiocítico (linfomas, en los que los linfocitos tienen diámetros grandes, núcleos vesiculares y nucléolos prominentes que aquellos de linfomas linfocíticos o indiferenciados) que a menudo afecta a un grupo de edad más joven (media de cuatro años) (Jacobs, 2002).

En cuanto al género del animal, para el caso de esta neoplasia, se ha reportado que la incidencia es la misma para hembras y machos (Merck, 1992); un menor riesgo ha sido descrito en hembras intactas (Priester *et al.*, 1980), pero la mayoría de las descripciones demuestran que el género no es un factor de riesgo importante (Parodi *et al.*, 1968; Priester *et al.*, 1980). Sin embargo, en un estudio retrospectivo de 186 casos de linfoma canino, realizado en Londrina, Estado de Paraná (Brasil), se concluyó que algunas razas definidas como Pastor Alemán, Rottweiler, Bóxer y Cocker Spaniel Inglés podrían influenciar en el género para la aparición del linfoma, siendo la edad media de presentación de dicho estudio de 5.9 años. En tanto Vezalli (2009), en un estudio retrospectivo de clasificación de 171 casos de linfoma determinó una variación desde 2 hasta 13 años (Media 7,9).

En cuanto a condición racial, existe predisposición por ciertas razas como Bóxer (Priester, 1967), Rotwailer, Terrier Escocés, Basset Hound, Airdale Terrier, Chow Chow, Pastor alemán, Poodle, San Bernardo (Rosenthal 1982), Bulldog Inglés, Beagle, Cobrador Dorado (Alvarez, 2001) y Scottish Terrier (Moulton, 1978). En el estudio retrospectivo realizado en Paraná, se determinó que las razas cruzadas tuvieron una mayor presentación que las razas puras, en cuanto a la condición corporal del animal, tuvo una influencia distinta en canes con raza pura y raza cruzada. Así mismo, Vezalli (2009) determinó que las razas cruzadas son las que presentan mayor frecuencia, seguido por los de raza Pastor Alemán 20.96% (26/124).

2.4. Clasificación del Linfoma Canino

2.4.1. Clasificación Anatómica

La clasificación del linfoma canino es basada en criterios anatómicos e histológicos (Couto, 2001). Se reconocen cinco formas del linfoma canino de acuerdo a su clasificación anatómica: multicéntrico, intestinal, mediastínico o tímico, cutáneo y extranodal; este último se subdivide en renal, neural y ocular (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

2.4.1.1. Linfoma multicéntrico

Es la forma más común en los perros, representa aproximadamente el 80% de todos los linfomas y se caracteriza por un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos, presentándose una linfadenomegalia generalizada, llegando a alcanzar de 2 a 15 veces el tamaño normal de los nódulos linfáticos, y puede afectar a otros órganos, como amígdalas (Fig. 2), médula ósea, bazo y el hígado, que puede ser incrementado en su tamaño como consecuencia de la infiltración con linfocitos neoplásicos (Wellman, 1996; Couto, 2001; Vail y Ogilvie, 2003).

Al corte de los nódulos linfáticos afectados se observa un tejido gris-blanquesino de textura blanda, similar a la observada en el bazo y en hígado (Searcy, 1998). En la mayoría de los casos, el cuerpo esplénico es uniforme, la pulpa blanca puede estar ampliada y microscópicamente se observa que se encuentra ocupada por linfocitos neoplásicos (Searcy, 1998). Malignidades hematopoyéticas tales como linfoma y trastornos mieloproliferativos pueden infiltrar de forma difusa a nivel del hígado, lo que produce hepatomegalia y un marcado patrón lobular en la superficie de corte, que se atribuye a una degeneración hepatocelular centrolobulillar debida a la anemia y a veces, a la acumulación zonal de las células neoplásicas (MacLachlan y Cullen, 1998).

2.4.1.2. Linfoma intestinal

El linfoma intestinal representa del 5 a 7% de los casos reportados, se caracteriza por infiltración local, multifocal o difusa de tejido linfoide en el intestino delgado, con aumento del tamaño de los nódulos mesentéricos (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002). Morfológicamente, la forma difusa es la forma más común en los perros, pero el linfoma puede ocurrir tanto en la forma nodular como en la forma difusa (Vail y Ogilvie, 2003) (Fig. 2). Cuando el linfoma es nodular, se palpa a nivel del examen clínico un segmento intestinal engrosado, se ha reportado que la zona ileocecólica presenta una mayor frecuencia de afectación, pudiendo provocar un estrechamiento luminal y obstrucción intestinal parcial (Kruiningen, 1998).

2.4.1.3. Linfoma mediastínico

El linfoma mediastínico representa el 5% de los casos y se caracteriza por la participación del timo (forma tímica) o los nódulos linfáticos mediastínicos a nivel del mediastino anterior (Fig. 2) (Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002). Se asocia con derrame pleural e hipercalcemia, que es causada por un aumento de la resorción ósea, probablemente mediada por una proteína relacionada con la hormona paratiroidea, producido por los linfocitos neoplásicos activos (Wellman, 1996).

2.4.1.4. Linfoma cutáneo

El linfoma cutáneo es uno de los tipos extraganglionares de mayor presentación en el perro (Couto, 2001). Implica lesiones cutáneas únicas o múltiples que pueden variar en gran medida en apariencia, puede imitar otros trastornos de la piel, tales como seborrea, pioderma y pénfigo. Las lesiones pueden comenzar como un leve eczema o placa pruriginosa (Fig. 2) y progresar a tumores nodulares, siendo en raras ocasiones este tipo de presentación (Ogilvie y Moore, 1995).

El linfoma cutáneo es la forma extranodal más común en el canino, siendo aproximadamente 3% al 8 % de los linfomas caninos. Esta forma cutánea puede adoptar dos formas: primaria, originada en piel y secundaria, la cual se asocia con linfomas encontrados predominantemente en otros sitios corporales y ambas derivan de las células T (Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).

2.4.1.5. Linfoma extranodal

Los diversos tipos de linfomas de Hodgkin incluyen localizaciones extranodulares como piel, ojo, sistema nervioso central, huesos, corazón, riñón y vejiga (Vail y Ogilvie, 2003). Las presentaciones de mayor frecuencia son la cutánea y la ocular. Los signos clínicos son muy variables y dependen de la localización, en general son consecuencia de la compresión que

ejerce la neoplasia o la invasión de las células malignas en el órgano afectado (Ettinger, 2003; Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002) (Fig. 2).

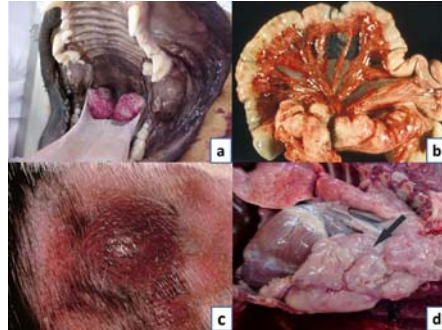


Figura 2. Linfoma según la distribución anatómica. a) Linfoma multicéntrico, b) linfoma intestinal, c) linfoma cutáneo y d) linfoma mediastínico.

2.4.2. Clasificación histológica del linfoma canino

Los linfomas se generan a partir de una expansión clonal de células linfoides con características morfológicas distintivas e inmunofenotípicas, debido a las numerosas similitudes entre el linfoma no Hodgking animal y el humano, la mayoría de las clasificaciones propuestas en animales fueron adaptadas de los esquemas humanos, teniéndose como resultado un valor clínico de dichas clasificaciones (Rappaport, 1966; Valli *et al.*, 2002). Esto no es sorprendente en vista a las fuertes similitudes funcionales y morfológicas de los linfonódulos normales entre humanos y de los animales (Laurent, 2001). Sin embargo lo ideal sería que una sola clasificación refleje las diferentes categorías morfológicas y tengan implicancias clínicas que puedan predecir el comportamiento de los diversos tipos y su respuesta a la terapia estándar. Además, la clasificación debe corresponder, en la medida de lo posible, con los conocidos mecanismos de la patogénesis del tumor y los orígenes de las células neoplásicas (Laurent, 2001).

El primer intento de clasificación del linfoma en el humano fue hecho por Gall y Mallory (1942), el cual incluye términos como linfoma folicular gigante, linfosarcoma y reticulosarcoma, los cuales no proveen una aplicación clínica precisa (Blood, 1997), sin embargo, en 1956, Henry Rappaport, propone una clasificación basada no sólo en la morfología celular (bien diferenciada, pobremente diferenciada o histiocítica), sino también en el patrón de crecimiento tisular de la neoplasia (folicular o difuso) (Padilla, 2009). Esta clasificación introdujo la idea, de que la arquitectura del tejido neoplásico es indicativa del pronóstico clínico

del tumor y es de ese modo que la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los tejidos linfoides ha basado sus principios en esta clasificación (Laurent, 2001).

El termino histiocítico fue aplicado a los tumores en lo que la mayor parte de los linfocitos tenían diámetros grandes, vesiculares y nucléolos más prominentes que aquellos de linfomas linfocíticos o indiferenciados; esto también se usó ya que las células malignas tienen algunas características morfológicas de los histiocitos benignos (Vail y Young, 2009), sin embargo, el inmunofenotipaje ha fallado en la documentación de una relación biológica entre estas células e histiocitos verdaderos, por ahora el termino es totalmente inapropiado. Además, este subgrupo de linfomas histiocíticos incluye tumores con características morfológicas e inmunofenotípicamente distintas, la clasificación de Rappaport no ha sido útil en proporcionar información pronóstica o para guiar la terapia en perros con linfoma porque el número de tumores foliculares en los perros es pequeño, el subgrupo problemático "histiocítico" y el fallo en el recuento de los diferentes tipos celulares morfológicos e inmunológicos (Weller *et al.*, 1980). Una crítica a este sistema de clasificación es el fallo al incluir los linfomas extranodales como una categoría separada, aunque hay diferencias reconocidas entre los tumores nodales y extranodales en el comportamiento biológico y en el pronóstico, la información comparativa sobre la histogénesis de estos tumores es desconocida, por ejemplo, en los humanos, los linfomas de células pequeñas que crecen desde MALT están compuestos de células con diferentes inmunofenotipos de los de otros linfomas de células pequeñas (Nathwani *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994).

Al final de los años sesenta, nuevas investigaciones sobre el sistema inmunológico y la fisiología de las células linfoides dieron lugar a nuevas orientaciones conceptuales, esencialmente, dos sistemas diferentes se han desarrollado, el llamado "Concepto americano", de Robert Luckes y el "Concepto Europeo" por Karl Lennert, siendo así la primera vez que se trató de distinguir entre linfomas derivados de los linfocitos de las series B y T (Padilla, 2009).

En 1974, la clasificación de Lennert y colaboradores, con el apoyo de la asociación europea del linfoma, fue publicada y denominada como "Clasificación de Kiel", esta clasificación se basa en que las células neoplásicas son equivalentes a las distintas formas citológicas normales de las células linfoides y que dichas células son (de forma permanente o no) bloqueadas ("congeladas") en una de las diversas etapas de la evolución normal de las células linfoides. Desde el punto de vista pronóstico, la clasificación de Kiel distingue dos grandes grupos de tumores, los linfomas de bajo grado y los de alto grado de malignidad, los términos utilizados por el linfoma maligno de bajo grado terminan con el sufijo "-cytic" (o "cytoid") y para los de alto grado con "blástica" (Padilla, 2009). La Clasificación de Kiel actualizada incluye el patrón

arquitectural, morfológico (centroblastico, centrocítico o inmunoblástico) e inmunofenotipo (células B o células T) de las células tumorales (Lennert y Feller, 19990).

Tanto en la Clasificación de Kiel y la de la Formulación del Trabajo (Working Formulation), se clasifican en categorías como malignidades de bajo grado, intermedio o alto grado. Los linfomas de bajo grado están compuestos de pequeñas células con un bajo índice mitótico, progresan típicamente de forma lenta y están asociadas con largas supervivencias pero son incurables, los linfomas de alto grado con alta tasa de mitosis progresan rápidamente pero probablemente responderán positivamente a la quimioterapia y, en los humanos, son curables potencialmente (Vail y Young, 2009).

Generalmente, las células de los tumores de bajo grado, son pequeñas, con ocasionales formas de una gran explosión mezcladas entre ellas, en contraste los tipos malignos de alto grado consisten en una población pura de grandes células "blásticas". La división básica en tumores de bajo y alto grado corresponde bien con los resultados de estudios cinéticos y no tiene en cuenta el patrón histológico de crecimiento. La clasificación original de Kiel fue muy útil para describir los diferentes tipos celulares, a pesar de no haber contado con técnicas de inmunohistoquímica, ya que no estaban disponible en aquel momento y por medio sólo del fenotipo celular, la clasificación de Kiel atribuye la mayor parte de los linfomas no Hodgkin a los linfocitos B y, en menor medida, a los linfocitos T (Laurent, 2001).

A principios de los años setenta, varias clasificaciones del linfoma no Hodgkin en el humano son propuestas, como las brindadas por el grupo de investigación británico Nacional de linfoma, y el grupo de estudio japonés del linfoma de la OMS (Padilla, 2009). De este modo, en una tentativa de armonizar todas estas propuestas, un programa institucional de estudio bajo el auspicio del Instituto Nacional del Cáncer en 1980 llamado " Proyecto de clasificación del linfoma no Hodgkin" realizó una clasificación de un total de 1250 linfomas no Hodgkin, los casos fueron clasificados por patólogos experimentados, utilizando seis de las clasificaciones más importantes, incluyendo la clasificación de Kiel así como la de Lukes y Collins (National Cancer Institute, 1982).

Por lo tanto, la clasificación de la Formulación del Trabajo (Working Formulation) no es una clasificación adicional, sino es un compromiso de unión entre la terminología empleada por clasificaciones anteriores con el fin de facilitar la comparación clínica de los ensayos terapéuticos (Laurent, 2001). La Working Formulation clasifica en categorías a los tumores según su patrón (difuso o folicular) y el tipo celular (p. ej. Células pequeñas partidas, células grandes, inmunoblásticas), pero no incluye información sobre el inmunofenotipo del tumor

(Lennert, *et al.*, 1990), los tipos de esta clasificación, están relacionados con la biología del tumor y la supervivencia del paciente (Vail y Young, 2009).

La diferencia más llamativa entre los linfomas caninos y humanos es la escasez de linfomas foliculares en el perro (National Cancer Institute, 1982). Algunos linfomas difusos en el perro quizás sean foliculares en su inicio, pero probablemente progresen a una forma difusa más agresiva en el momento del diagnóstico mediante biopsia. Sólo un pequeño porcentaje de los linfomas canino (del 5,3% al 29%) son considerados tumores de bajo grado (Vail *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1986). La mayor parte de los linfomas de bajo grado de células pequeñas son de origen de células de T (Fournel-Fleury *et al.*, 1997).

Los linfomas de alto grado aparecen frecuentemente si los linfomas difusos de células grandes, clasificados como grado intermedio en la Working Formulation, son considerados de alto grado, como en la clasificación de Kiel actualizada (en la cual son clasificados como linfomas difusos centroblasticos). Los linfomas caninos linfoblásticos son pocos comunes (Greenlee *et al.*, 1990; Carter Fournel-Fleury *et al.*, 1986). La mayoría de los linfomas de grado alto son de origen en células B (Fournel-Fleury *et al.*, 1997). Sin embargo, existe una diferencia documentada en la prevalencia de varios inmunofenotipos de linfoma basados en la raza (Modiano *et al.*, 2005). Por ejemplo, los Cocker Spaniels y los Doberman Pinchers tienden más probablemente más a linfoma de células B, los boxers probablemente más a linfoma de células T y los Golden Retrievers parecen tener la misma probabilidad de padecer tumores de células B y T (Vail y Young, 2009).

Para su utilidad clínica, estos sistemas de clasificación deben proporcionar información sobre la respuesta a la terapia, mantenimiento de la remisión y supervivencia, algunos estudios sugieren que los tipos en la Working Formulation pueden estar correlacionados con la supervivencia y el sistema de Kiel puede ser útil en la predicción de las recidivas (Teske, 1994; Ponce *et al.*, 2004). En la mayoría de los estudios, los linfomas de grado alto demuestran una respuesta completa a la quimioterapia significativamente más a menudo que los tumores de bajo grado. Sin embargo, los perros con tumores de bajo grado quizás sobrevivan un largo período de tiempo sin quimioterapia agresiva, los perros con linfomas de células T han demostrado una menor tasa de respuesta completa a la quimioterapia y un tiempo de remisión y supervivencia menores que los perros con tumores de células B (Vail *et al.*, 1996; Ruslander *et al.*, 1997), además los linfomas de células T tienden a asociarse con hipercalcemia (Weir *et al.*, 1988).

En la literatura veterinaria, del 60% al 80% de los casos de linfoma en perros son linfomas de células B; los linfomas de células T representan del 10% al 38%; la enfermedad mixta suma

al menos 22% y los tumores de células nulas (p. ej. No reactivos a células B ni T) representan menos del 5% (Vail y Olguivie, 2009) , el desarrollo de anticuerpos monoclonales para detectar marcadores específicos de linfocitos caninos ha conseguido que esté disponible de forma rutinaria la realización de inmunofenotipos de los tumores de los perros en algunos laboratorios comerciales. Estas técnicas incluidas también pueden ser desarrolladas en muestras incluidas en parafina y en especímenes citológicos obtenidos mediante aspiración por aguja fina (Fournel-Fleury *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 1995).

En 1994, el Grupo Internacional de Estudios del linfoma (ILSG) publicó una versión revisada de la Revisión Europeo-Americana del Linfoma (REAL), el sistema REAL combina la morfología de la célula tumoral, inmunofenotipo, características genéticas y manifestaciones clínicas, los tumores se clasifican como entidades distintas en lo que se refiere al comportamiento biológico pero sin considerar bajos y altos grados de separación como los realizados por Kiel y el Working Formulation, la inclusión de criterios clínicos es uno de los aspectos más novedosos de este enfoque, este sistema también hace hincapié en la distinción entre el grado histológico y la agresividad clínica (Padilla, 2009). Finalmente, el sistema REAL distingue entre las células B y células T derivadas de neoplasias que pueden tener la misma arquitectura, similar aspecto histológico y citomorfología; La disponibilidad de más marcadores inmunológicos en citología de animales durante los últimos años ha llevado a la identificación de numerosos nuevos tipos de linfoma y entidades de leucemia en animales con impresionantes analogías con sus contrapartes humanas (Alvarez, 2009). Esta es la razón por la que han adoptado la clasificación REAL para la nueva edición de la clasificación histológica de tumores hematopoyéticos y linfoides de animales domésticos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no sólo los tumores del sistema linfoides son incluidos sino también proliferaciones linfoides benignas y malignas, así como proliferaciones mieloides y diversos tumores como los de las células cebadas, timoma y Linfoma de Hodgkin se incluyen en esta clasificación (Laurent, 2001).

2.4.2.1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud

La clasificación de las neoplasias linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) adopta la Revisión Europea – Americana de Neoplasias Linfoides (REAL), propuesto por el Grupo Internacional de Estudios en linfoma (Valli, 2010). Esta clasificación se basa en la premisa de tratar de definir distintas entidades, utilizando toda la información disponible, incluyendo aspectos morfológicos, inmunofenotípicos, características genéticas y clínicas (Valli *et al.*, 2002), la clasificación propuesta reconoce las neoplasias de células B, T, de células asesinas naturales (Natural Killer) y enfermedad de Hodgkin (Vezalli, 2009). Las neoplasias de células B y T son estratificadas en precursoras, o linfoblásticas (Leucemia linfoblástica aguda y linfoma linfoblástico) y en maduras ("periféricas") de neoplasias B y T (Harris, 2000).

En los últimos años, se ha establecido una nueva clasificación de la OMS de enfermedades hematopoyéticas y tejidos linfoides, basándose en aspectos de la Asociación Europea de Hematopatología (EAHP) y de la Sociedad Americana de Hematopatología, esta clasificación incorpora al linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin y a todo tejido hematopoyético incluyendo mastocitos e histiocitos (Harris, 2000). Si bien esta clasificación se basa en muchos aspectos tomados del esquema de la clasificación REAL, nuevas y significativas consideraciones se han incorporado en la clasificación de la OMS para algunas categorías de linfomas y leucemias (Laurent, 2001).

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una versión revisada por la Revised European American Lymphoma (REAL), como base para definir las categorías histológicas de los tumores hematopoyéticos en los animales domésticos (Valli *et al.*, 2002). Esta clasificación fue adaptada de la medicina humana, y fue enriquecido por otros tumores hematopoyéticos y mieloides, bajo la dirección de patólogos especialistas, por lo tanto, dicha clasificación se elabora con independencia del origen tumoral, pues su principal objetivo es correlacionar cada categoría de linfoma a su propio comportamiento y grado de malignidad (Valli, 2010).

La identificación del linaje celular B o T es obligatoria y, en general se basa en el fenotipo celular después de la coloración hematoxilina-eosina y la confirmación diagnóstica se obtiene por medio del inmunofenotipo, además, debe considerarse la topografía tumoral (Laurent, 2001). Sin embargo, en el año 2007, la OMS reúne a un grupo de 138 hematopatólogos, miembros de la Asociación Europea de Hematopatología y 62 oncólogos clínicos, en una revisión actualizada de su última clasificación y de la REAL, donde la morfología es la principal

base del diagnóstico, sin embargo, el inmunofenotipo o inmunohistoquímica, la citogenética y la clínica, son recursos para definir un diagnóstico específico del linfoma o la leucemia y el diagnóstico surgirá de dichos elementos combinados (Padilla, 2009).

En cuanto al linfoma cutáneo, se define como un grupo heterogéneo de neoplasias que incluye una forma epiteliotrópica que se asemeja a la micosis fungoide y una forma no epiteliotrópica, la mayor parte de los linfomas tienen un fenotipo de células T (Moore *et al.*, 1994; Day, 1995).

En la clasificación histológica por la Organización Mundial de la Salud, el linfoma difuso de células B grandes que ocurre en todos los animales domésticos, es la neoplasia linfoide más común en la mayoría de las especies, incluyendo humanos, siendo confirmado por Valli (2007), el cual obtuvo 69 casos de linfoma de células grandes B difuso en una recolección de 502 casos de linfoma canino y leucemia. Además Vezzali (2009) reportó que un 80 –85% del total de las neoplasias linfoides tenían un origen de células B en un estudio realizado.

En cuanto a los tipos de linfoma, dentro del linfoma linfoblástico, las neoplasias linfoides de células T son más comunes en los animales que en seres humanos, en estos últimos es poco frecuente y representa alrededor del 2% de todos los linfomas no Hodgkin. En contraste, los perros que presentan leucemia linfocítica crónica (LLC) en aproximadamente el 75% son de tipo de células T (Valli, 2007).

El linfoma de células del manto, de reciente reconocimiento en patología humana, presenta una incidencia de alrededor del 3% - 10% de los casos de linfoma no Hodgkin en humanos (Swerdlow *et al.*, 2008). Un estudio realizado de un total de 461 casos, reveló 11 casos de perros con linfoma de células del manto, obteniendo una incidencia de aproximadamente 2% (Valli, 2007), sin embargo, en el año 2010, Valli menciona que el linfoma de la zona marginal puede llegar hasta un 15 – 17 % de los casos, sin embargo el reporta una incidencia de 3.7 % en un estudio realizado en el mismo año.

El linfoma de la zona marginal, el cuál se reconoce con más frecuencia en perros adultos, es el linfoma más común relacionado con la proliferación del centro germinal (Fig. 3). En las revisiones completas del linfoma canino, los tipos indolentes constituyen 20-25%, y de éstos, el linfoma de la zona marginal es el grupo más frecuente, en un estudio del Linfoma recurrente de células B, se obtuvo que 24/88 (27%) casos eran del tipo de bajo grado, y de éstos 13/88 (15%) fueron linfoma de la zona marginal. En una segunda revisión de los linfomas caninos por el Dr. William Kisseberth utilizando inmunohistoquímica, 17,4% de 380 (66/380) de los casos presentados inicialmente para el diagnóstico eran de tipo linfoma de la zona marginal.

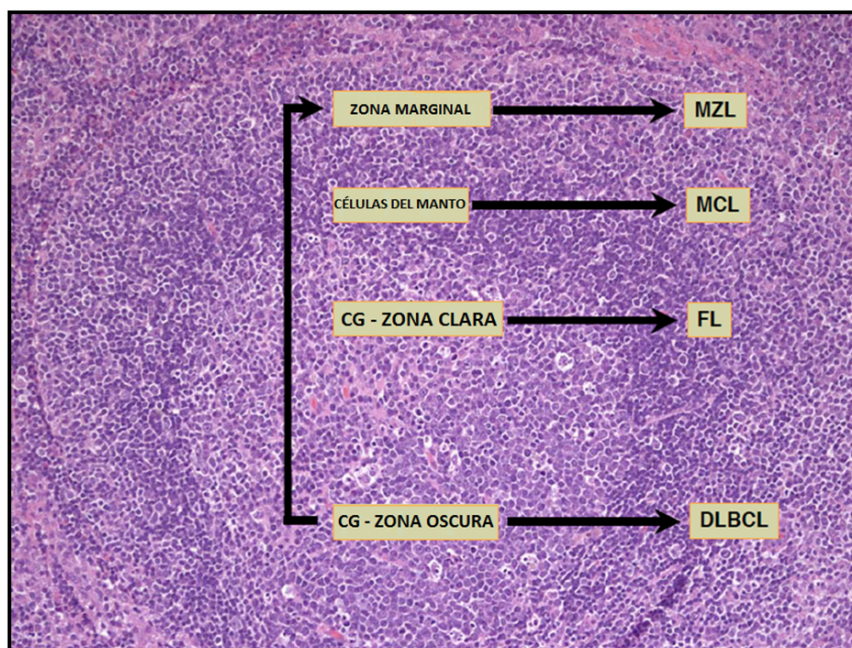


Figura 3. Zonas y capas del folículo linfoide histológicamente normal y el origen neoplásico de cada una de estas. Linfoma de la Zona Marginal (MZL), Linfoma de células del Manto (MCL), CG (Centro Germinal, linfoma folicular (FL), Linfoma de células B grande difuso (DLBCL).

En cuanto al linfoma humano, el linfoma de la zona marginal tipo MALT extraganglionar constituye alrededor del 8% de los casos de linfoma no Hodgkin (Valli, 2007). El linfoma de la zona marginal tipo nodular representa aproximadamente 1,8% de los linfomas no Hodgkin y el tipo esplénico representa cerca de 1% de los linfoma no Hodgkin humano. En los animales, el tipo de linfoma MALT rara vez se reconoce, debido a que los criterios para el diagnóstico del Linfoma MALT, rara vez se aplican en las superficies de mucosas como intestino, donde se produce con frecuencia este tipo de linfoma (Valli, 2007).

En los seres humanos, el linfoma de la zona marginal esplénico, es una enfermedad difusa, mientras que en el canino, el linfoma de la zona marginal esplénico no es raro ni difuso y se produce como una masa esplénica focal identificada a menudo en perros asintomáticos que son evaluados por otras razones (Valli, 2007).

El linfoma de la Zona T (LZT), es una neoplasia que es común en perros y muy poco común en otras especies, en un estudio de 502 casos de neoplasias hematopoyéticas realizado por Valli (2007), se hallaron 13 casos de linfoma de la Zona T en perros, en dicho estudio, sólo uno de estos casos fue en el linfonódulo mesentérico y los demás se presentaron en los linfonódulos periféricos y 5 en linfonódulos submandibulares y de forma generalizada en 4 casos, determinándose así, que este tipo de linfoma es frecuente hallarlo en linfonódulos

2.5. Presentación Clínica

Los signos clínicos son variables y las manifestaciones se dan conforme a la presentación de la extensión y localización del linfoma en el paciente canino. Generalmente, los signos clínicos varían, puede observarse conductas diversas, desde un perro alegre, normal y activo, hasta uno muy enfermo, siendo este último, de mal pronóstico. Otros signos clínicos inespecíficos incluyen depresión, anorexia, pérdida de peso y fiebre. (Ann, 1994).

En el linfoma multicéntrico, la historia que más frecuentemente se menciona es la aparición de una “masa debajo del cuello”, la cual es detectada por el dueño (Ann, 1994) además de una linfadenopatía multicéntrica indolora generalizada (Vail y Young, 2009). Periféricamente afectando a linfonódulos submandibular, retrofaringeo, preescapular (Fig. 4), poplíteo, inguinal, y axilar (linfonódulos incrementados hasta 2 a 15 veces del tamaño normal, indoloro para el animal y de libre movilidad), presentándose independientemente de padecer o no hepatomegalia (Ann, 1994). En ciertos casos, se pueden encontrar uno o más linfonódulos afectados (Vail y Young, 2009), si la linfadenomegalia es muy severa, puede causar obstrucción mecánica de los vasos linfáticos, dando como consecuencia edema en miembros y del rostro o compresión de vías respiratorias, induciendo tos en el paciente (Figuera *et al.*, 2002). Cuando se encuentra afectada la médula ósea se pueden observar citopenias que se reflejan clínicamente como infecciones, hemorragias y anemia (Merck, 2007). Sin embargo, la mayoría de los perros con linfoma multicéntrico no presentan signos graves de enfermedad sistémica (OMS subestadio a) (Cuadro 2).



Figura 4. Canino con nódulos linfáticos preescapulares aumentados de tamaño, consistencia firme, móviles y sin aumento de sensibilidad

Una gran variedad de animales enfermos presentan una severa caquexia, probablemente producto de una anorexia, que se cree que ocurre debido a la alteración en el paladar y olfato del

animal o por un efecto directo del tumor en el centro del apetito (Crow, 1992). Un 10 a 20% de los perros presentan hipercalcemia como síndrome paraneoplásico, estos pacientes presentan hiporexia o anorexia, depresión, pérdida de peso progresiva, vómito, emaciación, ascitis, diarrea, poliuria y polidipsia (OMS subestadio b) (Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002). Los perros con linfoma de células T tendrían una mayor probabilidad de presentar signos (OMS subestadio b) (Fournel-Fleury *et al.*, 2002).

Los perros con linfoma intestinal habitualmente presentan signos gastrointestinales no específicos (Fig. 5), como vómitos, diarrea, pérdida de peso y malabsorción (Skudder *et al.*, 1985; Leib *et al.*, 1987), Kruiningen (1998) describió clínicamente que se asocian a los animales que presentan un cuadro de diarrea difusa, pérdida de apetito, pérdida de peso, esteatorrea, vómito y anorexia. En ocasiones pueden aparecer signos de obstrucción intestinal y peritonitis, signo que puede ser causado por la ruptura de la masa linfomatosa (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003), el examen físico en estos animales revela masas intestinales intra-abdominales en pacientes con linfoma difuso del intestino delgado (Couto, 2001). El hígado, bazo y nódulos mesentéricos pueden o no estar involucrados (Meuten, 2002; Morris y Dobson, 2002).



Figura 5. Labrador de un año de edad con signos de emaciación, anorexia, depresión y fiebre. Canino diagnosticado con linfoma intestinal.

El linfoma mediastínico se caracteriza por aumento de los linfonódulos mediastínicos craneales o del timo o ambas y los signos clínicos están asociados a la presencia de tos, disnea, intolerancia al ejercicio, derrame pleural, disfagia y regurgitación (el último, más comúnmente en los gatos). Signos como poliuria, polidipsia, anorexia, debilidad e hipercalcemia (40 a 50%

de los casos) son comunes en perros con linfoma mediastinal (Dhaliwal y Kitchell, 2003; Ettinger, 2003; Meuten, 2002). Estos signos son causados por compresión de los linfonódulos mediastínicos anteriores, el cuadro clínico se complica debido al derrame pleural maligno que genera intolerancia al ejercicio y posible regurgitación (Vail y Young, 2009). El síndrome de Horner unilateral o bilateral puede ocurrir en gatos, y ocasionalmente en perros con linfoma mediastinal (Couto, 2001). Dependiendo de la gravedad de la hipercalcemia, puede haber una depresión del sistema nervioso central y coma (Vail y Ogilvie, 2003). Los perros con linfoma mediastínico también pueden presentar síndrome precaval, caracterizado por marcado edema de cabeza, cuello y patas anteriores secundario a la compresión por el tumor o a la invasión de la vena cava craneal (Vail y Young, 2009).

En cuanto a las localizaciones extraganglionares, los signos clínicos son muy variables y dependen de la localización de la neoplasia, con el resultado de la compresión o desplazamiento de las células normales como consecuencia de la invasión de las células malignas en el órgano afectado (Couto, 2001). Puede mostrarse signos inespecíficos como letargo, anorexia, pérdida de peso, poliuria y polidipsia (Figuera *et al.*, 2002), en etapas posteriores, muchos órganos son afectados, por la metástasis, aumentando aún más la gama de signos clínicos, se puede generar una inmunosupresión, con la cual habría debilitamiento del animal debido a la exposición a infecciones por agentes oportunistas (Couto, 2001).

En la forma cutánea de la enfermedad, suele ser generalizada o multifocal, los tumores aparecen como nódulos, placas, úlceras y dermatitis eritémica o exfoliativa. Inicialmente, se observa descamación, alopecia y prurito (Vail y Young, 2009). El linfoma epiteliotrópico de células T (p. ej. Micosis fungoides) tiene un curso clínico crónico, la erupción es un signo clínico característico. (Ogilvie y Moore, 1995). Es muy fácil confundir el diagnóstico por su presentación clínica tan variable y porque puede ser similar con otras enfermedades cutáneas, en ocasiones los pacientes son presentados para una segunda opinión después de haber sido tratados con terapias sistémicas o tópica con antibióticos, antimicóticos o esteroides, y que no han sido exitosas a causa de un diagnóstico errado (Vail y Ogilvie, 2003).

Las lesiones cutáneas pueden ser aisladas o generalizadas, e incluyen nódulos, placas o nódulos, pústulas, úlceras, eritroderma, despigmentación y dermatitis exfoliativa. El tamaño de las áreas afectadas varía desde pequeñas hasta grandes placas o nódulos, se inician lesiones coalescentes de parches eritematosos con alopecias y escaras en cabeza y cara, que van progresando hacia el tronco, estas evolucionan a placas eritematosas circulares e irregulares, algunas con ulceración central y formación de costras en bordes mucocutaneos. Tanto los

parches como las placas pueden sufrir regresión y reaparecer tiempo después, o progresar en una forma más agresiva, apareciendo nódulos de tamaño variable, solitarios o múltiples, firmes, elevados, de color rojo oscuro, brillosos, con escamas o ulcerados y con exudado seroso que tiende a formar costras, si estas son removidas, la piel se observa hemorrágica e hiperémica. Es común que se encuentren infecciones bacterianas secundarias, que ocasionan mayor prurito y mal olor, en este estadio puede llegar a progresar hacia nódulos linfáticos u otros órganos. En un tercio de los casos, la cavidad oral está involucrada, y presenta lesiones nodulares o placas eritematosas en mucosa, encías y labios. Los caninos que presentan linfoma cutáneo de tipo epiteliotrópico tienen mayor tiempo de supervivencia que los que presentan un linfoma cutáneo no epiteliotrópico (Alvarez, 2011). También ocurre la afectación oral, la cual puede parecer como lesiones multicéntricas, eritematosas, en forma de placas o nódulos en las encías o labios (Muller *et al.*, 1989).

El linfoma ocular en el canino se asocia con mayor frecuencia de manera secundaria a la forma multicéntrica, se caracteriza por lesiones que incluyen engrosamiento del iris, uveítis, hemorragia retinal, infiltrado conjuntival, queratitis intersticial, hipema, sinequia posterior, hipopión, glaucoma, masas oculares, afección retinal e infiltración a nivel del nervio óptico (Nyland y Park, 1983).

En un estudio de 94 casos de linfoma multicéntrico canino, el 37% tuvo cambios oculares compatibles con linfoma y en una serie de 102 casos de uveítis en perros fue secundario a linfoma en el 17% de los casos (Krohne *et al.*, 1987; Massa *et al.*, 2002). La uveítis anterior fue observada más frecuentemente en avanzados estados de la enfermedad (estadio V), los perros con linfoma intravascular generalmente tienen signos relacionados con el SNC, sistema nervioso periférico (SNP) o afectación ocular (Bush *et al.*, 2002; Ridge y Swinney, 2004) incluyendo paraparesis, ataxia, hiperestesia, convulsiones, ceguera, letargia, anorexia, pérdida de peso, diarrea, poliuria, polidipsia y fiebre intermitente.

Los perros con linfoma primario del SNC pueden presentar afectación multifocal o solitaria (Couto *et al.*, 1984; Rosin *et al.*, 1982). También se han descrito convulsiones, parálisis y paresis, además de anormalidades neurológicas multifocales (Vail y Young, 2009).

Los perros con linfoma hepatoesplénico generalmente tienen signos no específicos como letargia, inapetencia y debilidad (Vail y Young, 2009). En cuanto a linfomas indolentes son linfomas que no presentan signos clínicos marcados, son similares a los linfomas de células B,

de bajo grado en humanos; estos tipos de linfoma surgen de periodos largos de hiperplasia benigna folicular linfoide, e incluyen al linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfomas de la zona marginal de tipo de células B, T y linfoma de la zona T (Valli, 2006). Los linfomas indolentes comparten una tasa mitótica y velocidad de progresión clínica baja, además en etapas avanzadas retienen las mismas características citomorfológicas, pero pierden la arquitectura folicular (Valli, 2006).

El diagnóstico diferencial de la linfadenopatía depende de la historia de viajes del perro (p. ej. Relativa a enfermedades infecciosas), tamaño y consistencia de los nódulos linfáticos afectados, otras causas de linfadenopatía incluyen las infecciones bacterianas y víricas, parásitos (*Toxoplasma* y *Leishmania spp*), organismos rickettsiales (*Ehrlichia* so.) y agentes fungales (*Blastomices* e *Histoplasma spp.*) (Vail y Young, 2009). La potencial hipercalcemia que acompaña a enfermedades sistémicas fúngicas, puede complicar aún más la diferenciación con el linfoma, los nódulos linfáticos discretos, duros y asimétricos, si particularmente se fijan a los tejidos subyacentes, quizás indiquen tumores metastásicos, como los mastocitomas o los carcinomas, enfermedades inmunomediadas (p. ej. el pénfigo, el lupus eritematoso sistémico) también pueden ocasionar un leve a moderado incremento de tamaño de los nódulos linfáticos (Vail y Young, 2009).

2.6. Síndromes paraneoplásicos

Dentro de los síndromes paraneoplásicos hematológicos, la anemia es una anomalía frecuentemente encontrada en casos de linfoma (Fig. 6), se presenta en casi 40% de los casos, y esta se relaciona con inflamación crónica, tiempo de vida reducida de los eritrocitos y al metabolismo anormal del hierro (Baskin *et al.*, 2000; Dobson *et al.*, 2001), sin embargo, también puede estar relacionado con la producción de otros factores humorales, incluida la interleuquina – 1 (IL-1), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), factor beta de transformación del crecimiento (TGF - β) y análogos de la vitamina D (Harris *et al.*, 1994; Wellwe y Hoffman, 1992; Gerger *et al.*, 2004).

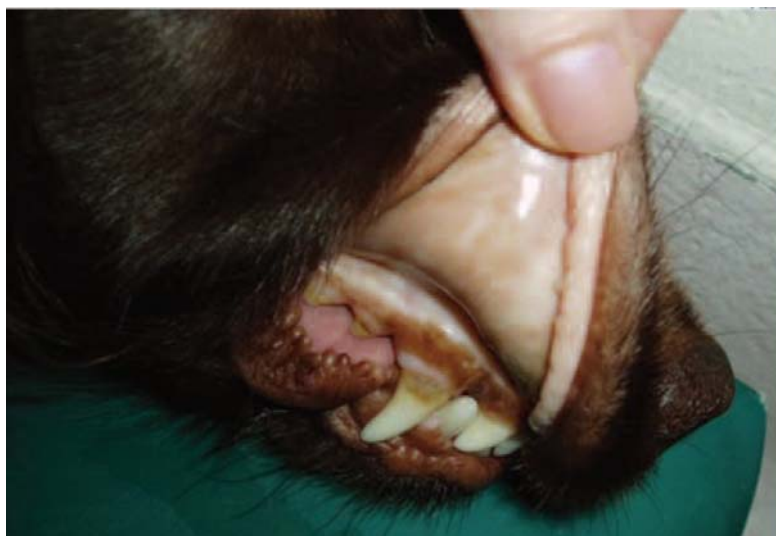


Figura 6. Mucosas pálidas en un canino con linfoma

En estudios publicados por Ettinger (2003), la anemia se asocia con un tiempo corto de supervivencia y con mala calidad de vida en los pacientes con linfoma. Generalmente, el tipo de anemia es la de tipo normocítica normocrómica no regenerativa (Moulton, 1978); en algunos casos se presenta una anemia no regenerativa, hipocrómica y microcítica, con mediana reticulosis, debido a la pérdida de hierro por la neoplasia sangrante que se puede presentar a nivel intestinal (linfoma intestinal) (Carlton y McGavin, 1988). Sin embargo, un pequeño porcentaje de los animales tienen índices consistentes con la pérdida de sangre o hemólisis (Vail y Ogilvie, 2003). Dentro de los síndromes paraneoplásicos hematológicos, se pueden mencionar a la monocitosis y a reacciones leucemoides, debido a la producción de sustancias bioactivas, tales como factor de crecimiento hematopoyético y a las interleucinas producidas por las células tumorales (Bunn y Minna, 1995). La hipercalcemia se caracteriza clínicamente por anorexia, pérdida de peso, debilidad muscular, letargia, poliuria, polidipsia y, raramente, depresión del SNC y coma (Weller, 1985).

La trombocitopenia, puede ser detectada en un 30% a un 50% de los casos (Vail y Young, 2009), en los casos que se presentan en perros adultos, esta alteración se produce como consecuencia a una disminución en la producción plaquetaria, secundaria a una invasión directa a la médula ósea (mieloptisis) y una capacidad disminuida a la médula ósea para producir megacariocitos (Alvarez, 2001).

La eritrocitosis, es otro síndrome paraneoplásico que se presenta por el aumento de la masa eritrocitaria, los signos clínicos asociados son dilatación vascular, deterioro del flujo sanguíneo,

hipoxia tisular, hemorragia y trombosis (Madewell, 2002). La coagulación intravascular diseminada se presenta en caninos con linfoma, trastorno que se relaciona a una alteración de los niveles de fibrinógeno, que puede estimular la producción de proteínas procoagulantes, también sustancias proagregantes de plaquetas, que promueven la formación inicial de un coágulo (Arriola, 2006).

Dentro de los valores leucocíticos, en caso del linfoma, se evidencia un hemograma normal en aproximadamente 20 – 40% de los perros, sin embargo se produce leucocitosis con neutrofilia en 20 -40% de los pacientes (Ann, 1994), en tanto, la leucocitosis neutrofílica, se presenta en muchos casos, y se produce debido al aumento de la producción del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) y el factor estimulante de macrófagos (GM-CSF), o como respuesta a la necrosis de células tumorales (Moulton, 1978), dicha leucocitosis tendría la función de prevenir la neutropenia febril y una posible infección secundaria (Bergman, 2000). La leucemia y el linfoma con leucemia circulante deberían ser considerados en el diagnóstico diferencial de la leucocitosis, en algunos casos de linfoma sin leucemia, la necrosis dentro del tumor induce neutrofilia, en raras ocasiones, la infiltración difusa linfomatosa o leucémica de la médula ósea (mieloptisis) produce una leucopenia, por lo general en asociación con anemia y trombocitopenia (Merck, 2007). En cuanto al número de linfocitos en sangre, en muchos casos no hay ningún incremento, ni relativo, ni de sus formas inmaduras, sin embargo, hay casos en los que inicialmente, el recuento total de células blancas es normal, pero tras un seguimiento, puede incrementarse relativamente y ser sobre todo linfocitos de tipo inmaduros, tanto en prolinfocitos como linfoblastos (Moulton 1978) y ocurre en aproximadamente el 20% de los perros afectados (Jain, 1986). Los linfocitos atípicos circulantes pueden indicar afectación de la médula ósea y leucemia, la diferenciación del linfoma multicéntrico con afectación de la médula ósea (p. ej. enfermedad estadio V) de una leucemia linfoblástica primaria, es importante, ya que el pronóstico es totalmente diferente (Vail y Oguilvie, 2009).

Dentro de los síndromes paraneoplásicos generales, la fiebre, la inmunosupresión, caquexia e hipergammaglobulinemia, son síndromes que se presentan en perros con linfoma, la fiebre se presenta en la mayoría de los casos como una reacción ante una infección, pero en los casos de neoplasias, esta puede estar asociada a la metástasis al sistema nervioso central, y en casos de tratamiento puede producirse por efectos de quimioterápicos o como consecuencia de una reacción a una transfusión de sangre y efectos colaterales de la radioterapia (Madewell, 2002).

La inmunosupresión es producto de una respuesta inmune celular, humoral o no específica deteriorada especialmente en los tumores del sistema linfóide, debido a que estas células son las responsables de la defensa del individuo (Slauson y Cooper, 2002).

La caquexia, se relaciona con animales que presentan anorexia, los cuales se observan débiles; algunas veces debido a la inadecuada alimentación que se les brinda, sin embargo, algunos caninos con procesos neoplásicos se alimentan adecuadamente y pierden peso, existen cambios en el metabolismo de los carbohidratos debido al incremento de energía en estos procesos, algunas veces asociados a cambios en la insulina, como al metabolismo de lípidos y proteínas. Estos cambios en el metabolismo han sido atribuidos al factor de necrosis tumoral α (TNF - α) también conocido como caquetin, cuya producción se incrementa a nivel de macrófagos debido a enfermedades crónicas como es el caso de enfermedades neoplásicas (Slauson y Cooper, 2002).

La Hipergammaglobulinemia es un síndrome paraneoplásico que se produce por la excesiva producción de proteínas de la línea de inmunoglobulinas monoclonales producidas por células plasmáticas o linfocitos (Bergman, 2000), pero es de menor presentación a comparación de otros síndromes como por ejemplo, la hipercalcemia (Morris, 2001), se han descrito en aproximadamente en el 6% de perros con linfoma (McEwen *et al.*, 1977).

En caso de los síndromes paraneoplásicos bioquímicos, el de mayor relevancia es la hipercalcemia, este es uno de los síndromes más frecuentes, siendo el 15% de los perros con linfoma que presentan hipercalcemia (30 a 40% de aquellos que presentan afectación mediastínicas y aproximadamente el 35% de aquellos con linfoma de células T) (Madewell *et al.*, 1986), debido a la invasión de células malignas en el hueso y la médula ósea, liberando factores que involucren la resorción del hueso y factores activadores de osteoclastos y linfoxina hipercalcemia osteolítica local (Arriola, 2006, Slauson y Cooper, 2002); Producto de este síndrome se observa signos como vómitos, constipación, debilidad muscular, insuficiencia renal crónica irreversible, depresión, encefalopatías, coma y muerte (Arriola, 2006). En un estudio en el que se asociaron varios factores entre ellos, las concentraciones elevadas de calcio, se encontró que se relaciona con un estadio clínico avanzado y es de mal pronóstico en los casos de linfoma, (Baskin *et al.*, 2000; Dobson *et al.*, 2001; Ettinger, 2003).

Otros tumores que producirían una hipercalcemia son los adenocarcinomas peritoneales, carcinomas del saco anal, carcinomas mamarios y adenomas paratiroides (Ann, 1994). En caninos hipercalcémicos, en los cuales presentan infiltración neoplásica extensa en ambos riñones, y en los deshidratados aparecen ascensos de nitrógeno ureico sanguíneo y de creatinina

(Ann, 1994). Una elevación de las enzimas hepáticas séricas o de la bilirrubina puede indicar una infiltración del hígado (Vail y Ogilvie, 2003).

La hiperproteinemia es otra anomalía que aparece como síndrome paraneoplásico raramente secundaria a la producción de proteína monoclonal por las células de linfoma y puede dar lugar a síndromes de hiperviscosidad (Couto, 2001), en tanto, la hipoproteinemia se observa más a menudo en animales con linfomas alimentarios, si los perros tienen las proteínas totales altas o un incremento en la fracción de globulinas en el perfil bioquímico, deberían ser evaluadas las proteínas séricas mediante electroforesis sérica (Vail y Young, 2009).

Un hallazgo muy común es el aumento de enzimas hepáticas como la alanina amino transferasa, aspartato amino transferasa y fosfatasa alcalina (ALT, AST, FA) y bilirrubina, los cuales pueden ser el resultado de una infiltración del parénquima hepático. Es necesario recordar que tratamientos con corticoides, también producen aumentos moderados de estas enzimas, puede observarse hipoalbuminemia cuando hay compromiso hepático o infiltración intestinal (Vail y Olguivie, 2009).

2.7. Comportamiento biológico

En el linfoma, las células son potencialmente metastásicas a otros linfonódulos multicéntricos, el comportamiento varía, desde enfermedades indolentes con una larga supervivencia y pocas posibilidades de curación, hasta tumores agresivos de evolución rápida con corta supervivencia, pero con posibilidades de curación (Socarrás, 2005). Las formas localizadas se infiltran rápidamente en los tejidos subyacentes, es por ello, que es importante considerar un tratamiento sistémico, indispensable para las formas localizadas (quimioterapia sistémica) o si fuera posible la cirugía y el tratamiento adyuvante (radioterapia en particular). Además, los linfomas de bajo grado son pequeñas células bien diferenciadas que evolucionan más lentamente que las de alto grado (células linfoblásticas y muy indiferenciadas), pero que responden mucho mejor a la quimioterapia (Doliger, 2003).

2.8. Diagnóstico

El linfoma puede ser diagnosticado por medio de exámenes citológicos o histopatológicos, el diagnóstico precoz depende de la forma de presentación del linfoma (Teske, 1994; McEwen y

Young, 1996). La forma multicéntrica es rápidamente diagnosticada, debido a la presentación clásica de linfadenopatía, bastando al clínico realizar una biopsia aspirativa por punción con aguja fina y biopsia incisional de linfonódulos superficiales aumentados para llegar al diagnóstico (Teske y Heerde, 1996). Sin embargo, el médico clínico, puede utilizar otros exámenes complementarios para poder realizar un diagnóstico diferencial con otras posibles causas de linfadenopatía, en tanto, el diagnóstico de las presentaciones extranodales es más complicado por existir otras enfermedades que causan los mismos signos clínicos relativos a cada presentación (McEwen y Young, 1996).

Después del examen confirmatorio, son necesarios exámenes complementarios para averiguar el compromiso de otros órganos que pueden tener sus funciones alteradas, debido a la infiltración de células neoplásicas, por lo tanto, se recomienda realizar el diagnóstico en base a la historia clínica, examen físico completo, biopsia aspirativa de ganglio linfático, evaluación de médula ósea, histopatología e inmunohistoquímica, hemograma completo con recuento de plaquetas, perfil bioquímico, uroanálisis, radiografía torácica y abdominal, ultrasonografía de abdomen y tórax, electrocardiograma y ecocardiograma, pues algunos fármacos como la doxorubicina son potencialmente cardiotóxicos (dosis acumulativa) (Teske y Heerde, 1996). Sin embargo, en algunas ocasiones podría ocurrir la presencia de líquidos cavitarios (efusiones), que deben ser analizados para una adecuada clasificación y diagnóstico de linfoma por la detección de células neoplásicas en el sedimento de estos líquidos (Teske, 1994).

2.8.1. Diagnóstico Clínico

2.8.1.1. Anamnesis

Alrededor de un 20 - 40 % de los perros con linfomas multicéntricos presentan sistémicamente malestar con una combinación de pérdida de peso, letargo, inapetencia y episodios febriles, los propietarios mencionan la aparición de nodulaciones que aparecen en la región de los nódulos linfáticos, los signos clínicos asociados dependen de la ubicación de la neoplasia (Gear, 2009). La historia clínica debe incluir una evaluación antes y después del consumo de agua y frecuencia urinaria, que puede reflejar una hipercalcemia y una nefropatía posterior (Vail y Ogilvie, 2003).

2.8.1.2. Examen físico

Para la forma multicéntrica, la palpación de todos los nódulos linfáticos periféricos debe realizarse, éstos pueden variar de tamaño, de leve a marcada, se deben tener en cuenta los linfonódulos que no son fácilmente palpables en el perro (por ejemplo, axilar, y los nódulos linfáticos inguinales) (Gear, 2009), y no se debe de dejar de explorar los linfonódulos sublumbares, a nivel de la palpación rectal, pues Vail y Young (2009) reportan que una significativa proporción de perros tienen pólipos rectales que consisten en agregados de linfocitos neoplásicos. El examen físico debe involucrar a las vísceras abdominales, lo cual es de importancia, debido a la participación visceral del linfoma, que puede conducir a una insuficiencia orgánica; es necesario buscar cualquier otro signo físico que puede ser indicativo de una enfermedad hepática o nefropatía (Vail y Ogilvie, 2003).

Se deben examinar las membranas mucosas en busca de signos de palidez, petequias o ulceraciones, debido a los síndromes paraneoplásicos y a la posible implicación de la médula ósea que se traduce en alteraciones hematológicas o quizás sea una evidencia de un fallo orgánico mayor o uremia (Vail y Ogilvie, 2003). Los signos vitales pueden ser normales en algunos pacientes, sin embargo, puede haber pacientes con un aumento de la frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y fiebre.

La frecuencia respiratoria puede aumentar como resultado de un derrame pleural o por un compromiso pulmonar, la percusión también puede ayudar a identificar las áreas de matidez, que podría correlacionarse con una masa mediastínica o fluido pleural (Ann, 1994).

El corazón, puede ser auscultado caudalmente si se encuentra desplazado por una masa mediastínica, la palpación abdominal puede revelar organomegalia, engrosamiento de la pared intestinal o linfadenopatía mesentérica (Vail y Young, 2009), pero el diagnóstico por imágenes es a menudo necesario para diferenciar hepatomegalia de esplenomegalia.

Para la forma extraganglionar ocular, los exámenes de fondo de ojo son indicados, pues anomalías oftálmicas se encuentran en más de un tercio de los perros con linfoma (Vail y Ogilvie, 2003). En caso de los linfomas a nivel del sistema nervioso, el examen neurológico ayuda a localizar una lesión sospechosa, que puede ser multifocal o aislada (Gear, 2009).

2.8.2. Diagnóstico patológico

El diagnóstico patológico involucra los aspectos macroscópicos que se hallan a la necropsia. Para el caso de la forma multicéntrico, el corte de los nódulos linfáticos afectados evidencian un tejido gris-blancuesino blando, similar a la observada en el bazo y en hígado (Searcy, 1998).

A nivel esplénico, se presentan nódulos firmes, solitarios o múltiples, elevados y usualmente confinados a la superficie capsular del órgano, sobresaliendo de la superficie de corte, sin embargo, es necesario el diagnóstico diferencial con otras neoplasias como fibroma, fibrosarcoma, osteosarcoma, mixosarcoma, lipoma, liposarcoma, leiomioma y leiomiosarcoma, los cuales raramente se puede presentar una esplenomegalia uniforme (Fig. 7), (McGavin, 2006), en la mayoría de los casos de linfoma, el cuerpo esplénico es uniforme, la pulpa blanca puede estar ampliada y microscópicamente se observa que se encuentra ocupado por linfocitos neoplásicos (Searcy, 1998).



Figura 7. Linfoma esplénico. Múltiples nódulos a nivel de la superficie del parénquima.

Las lesiones cardíacas, pueden presentarse en perros y gatos, la infiltración neoplásica puede ser nodular o difusa envolviendo el miocardio y pericardio, el tejido linfomatoso aparece como masas blancas similares a depósitos de grasa (McGavin, 2006).

En la piel, las lesiones macroscópicas son variables, se pueden tener lesiones en piel de color rojizo, ulceraciones a nivel de uniones mucocutaneas, despigmentación, masas simples o múltiples, lesiones infiltrativas o ulcerativas (McGavin, 2006).

A nivel del tracto gastrointestinal, se obtienen masas ulceradas expansivas a nivel de la submucosa; a nivel gástrico, esta lesión es atípica de la enfermedad, la ulceración es poco común y ocurre en la enfermedad en estadios terminales cuando la masa es muy grande y sobresale del lumen gástrico, en la mayoría de los casos, el epitelio de la mucosa está intacta y no está ulcerada (McGavin, 2006).

La «poliposis linfomatoide», en la que se identifican múltiples pólipos linfoides en intestino delgado y grueso es relativamente característica del linfoma de células del manto, también puede ser causada por otros linfomas no Hodgkin, particularmente el linfoma folicular y el linfoma de zona marginal tipo MALT (Valli, 2007). Estos pólipos pueden estar asociados con grandes masas tumorales, habitualmente ileocecales y linfadenopatía regional, aunque esta presentación clinicopatológica es relativamente característica del linfoma de células del manto, también puede estar causada por otros linfomas no Hodgkin, en otros casos, los hallazgos macroscópicos consisten en úlceras superficiales, grandes masas tumorales o engrosamiento difuso de la mucosa (Balagué, 2004).

Un estudio prospectivo ha demostrado infiltración microscópica de la mucosa gastrointestinal por linfoma de células del manto, sin lesiones macroscópicas aparentes, en un elevado número de pacientes (Valli, 2007). En algunos casos la infiltración glandular por las células tumorales puede simular lesión linfoepitelial, haciendo difícil el diagnóstico diferencial con el linfoma de zona marginal, de todas formas la escasez de estas lesiones y el aspecto monótono del infiltrado linfoide debería sugerir el diagnóstico de linfoma de células del manto (Balagué, 2004).

A nivel intestinal, se pueden observar masas solitarias, metastásicas o multicéntricas. Rosciani (1994) describe las masas del linfoma alimentario como formaciones ovoides ubicadas en la raíz del mesenterio, de superficie externa lisa, grisácea con red vascular evidente, consistencia friable, observándose una superficie de corte grisácea con áreas blanquecinas.

A nivel hepático, el linfoma es una de las neoplasias que con mayor frecuencia genera metástasis, y como consecuencia, una expansión difusa del órgano y de forma nodular, sin embargo, existen formas de presentación variables, desde un patrón lobular marcado en la superficie de corte, o adquirir un aspecto nodular. El aspecto característico de afectación difusa, es atribuible a la degeneración hepatocelular centrolobulillar por anemia tanto en el linfoma y trastornos mieloproliferativos y debido a la ubicación específica de acumulaciones de células neoplásicas (MacLachlan y Cullen, 1998); cuyos lugares incluyen zonas portal y periportal para los linfomas y sinusoidal para trastornos mieloproliferativos (Ann, 1994).

A nivel renal, el linfoma se presenta como focos neoplásicos que aparecen como nódulos simples o múltiples, homogéneos de color blanco grisáceo o de manera infiltrativa difusa causando un agrandamiento uniforme y decoloración pálida del riñón (McGavin, 2006).

2.8.3. Diagnóstico citológico

El diagnóstico citológico ha sido destacado como una herramienta eficiente para el diagnóstico de múltiples entidades patológicas en numerosas oportunidades (Allen y Prasse, 1986; Larkin, 1994; Duncan, 1993). Su aporte es considerado especialmente valioso para el diagnóstico de linfomas, ya que autores como Qizilbash (1985), Wilkersonl (1985), Moriarty (1989), Fournel-Fleury (1997), destacan la posibilidad de realizar diagnósticos específicos (variedad citológica de linfoma) en base a la observación de preparados obtenidos por punción (Rosciari, 1994).

Los aspectos citológicos del nódulo linfático se caracterizan por una proliferación neoplásica de linfocitos con núcleos grandes, nucléolos aislados prominentes y pleomórficos (linfoma linfoblástico). En algunos casos se produce la proliferación de linfocitos pequeños con cambios atípicos leves (linfomas linfocíticos) (Martines de Merlo, 2009). En la mayoría de los casos se podrá realizar un diagnóstico de linfoma evaluando los aspirados de aguja fina procedentes de los nódulos linfáticos afectados o de otros tejidos (Cowell, 2009).

Típicamente, la mayoría de las células son células linfoides grandes (más grandes que los neutrófilos) y quizás presenten nucléolos visibles y citoplasma basófilo, sin embargo, se debe tomar también muestra de tejido para histopatología, inmunocitoquímica y evaluación molecular (Cowell, 2009), debido a que en la citología, no se mantiene la arquitectura en los especímenes citológicos, la desaparición del nódulo linfoide o la ruptura capsular puede no ser detectada, por lo tanto, una hiperplasia reactiva marcada caracterizada por el incremento en el número de grandes células linfoides quizás sea difícil de distinguir de un linfoma y los linfomas de células pequeñas, los cuales presentan pocos indicios que indique su malignidad (Vail y Young, 2009). Con esto se consigue la confirmación del diagnóstico y el tipo exacto, proporcionando información para el posterior seguimiento del diagnóstico y tratamiento (Rosciari, 1994). Se debe tener en cuenta que las células linfáticas son frágiles y las extensiones procedentes de material aspirado deben de ser realizadas sin ejercer demasiada presión al extender el material en el portaobjetos (Vail y Young, 2009).

Para diagnosticar linfoma por citología de una manera fiable, se debe tener más del 50% de células inmaduras de la población celular, pero hay que tener en cuenta que en los estadios iniciales puede haber bajo número celular, haciendo el diagnóstico más difícil sólo por evaluación citológica (Martines de Merlo, 2009), normalmente, estos linfocitos neoplásicos son

más grandes que los neutrófilos y tienen una cromatina dispersa finamente granular, nucléolos, proporción núcleo/ citoplasma y citoplasma basófilo (Cowell, 2009).

Los linfocitos se consideran medios o grandes si su núcleo es respectivamente de 1,5 a dos, o de dos a tres veces el tamaño de un hematíe. Con frecuencia, el porcentaje de estos linfocitos supera el 80%, haciendo el diagnóstico muy seguro (Cowell, 2009). Las mitosis son más numerosas que en la hiperplasia y los cuerpos tingibles de los macrófagos indican intensa linfopoyesis y recambio celular, aunque por sí solos, estos criterios no son indicadores fiables de neoplasia. Los cuerpos linfoglandulares son más numerosos que en la hiperplasia (Valli, 2007).

Esporádicamente, el linfoma se manifiesta con linfocitos pequeños bien diferenciados (Cowell, 2009). Su diagnóstico se basa en el reconocimiento de una monótona y única población de linfocitos pequeños de apariencia normal (Fighera *et al.* 2002), siendo las mitosis muy infrecuentes, esta forma es muy difícil de distinguir de la hiperplasia porque los linfocitos pequeños predominan en ambas (Cowell, 2009), en algunos casos, los linfomas de células pequeñas no se diagnostican hasta que hay implicación sanguínea. El linfoma digestivo, de vez en cuando, aparece en forma de linfocitos neoplásicos que contienen gránulos magenta intracitoplasmáticos y se define como un linfoma grande granular (Cowell, 2009).

2.8.4. Diagnóstico histopatológico

La histopatología es una herramienta fundamental en el diagnóstico del linfoma, es un examen que proporciona mayor información que la citología, debido a que en la histología se puede observar proliferaciones clonales de linfocitos y su patrón de distribución en los linfonódulos (Fournel-Fleury *et al.* 1997). Estos aspectos pueden ser útiles en algunos tipos de linfoma y en los estadios iniciales de los mismos, donde la proporción de la proliferación clonal de linfocitos en el linfonódulo, no está marcadamente aumentado pero por su distribución anormal, permite realizar un diagnóstico, como es en el caso del linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, y linfoma folicular (Valli *et al.* 2006). De este modo, para cada tipo de linfoma hay características citológicas y patrones histológicos que nos permite identificar los principales criterios que evidencian muchos subtipos de linfoma que se presentan comúnmente (Cuadro 1 y 2).

En caso del linfoma intestinal o alimentario, debe obtenerse una biopsia en cuña o por cirugía abierta, con suficiente tejido adecuado; esto es importante debido a la dificultad que conlleva la diferenciación del linfoma con la enteritis linfoplasmocitaria, pudiendo confundir en aquellas muestras de biopsia que sean muy superficiales (Vail y Young, 2009).

2.8.5. Diagnóstico Molecular

Las técnicas moleculares pueden ser usadas para establecer un diagnóstico de linfoma o para una caracterización posterior de la neoplasia, después de realizar el diagnóstico inicial, los tejidos y células de la sangre periférica, nódulos linfáticos o de otras localizaciones pueden ser localizados mediante técnicas histoquímicas y citoquímicas, inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas, por citometría de flujo y técnicas de PCR. Por ejemplo, el inmunofenotipo del tumor (células B o T), tasa de proliferación (p. ej. la expresión de Ki-67, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) AgNORs (argyrophilic nucleolar organizing regions) y clonación (PCR del PARR)) (Weir, 1988; Hahn *et al.*, 1999).

La disponibilidad de estos análisis se está incrementando, aunque con frecuencia sólo el inmunofenotipo da una predicción consistente del pronóstico en el perro, por lo tanto, las técnicas moleculares, además de ayudar al diagnóstico, pueden ser útiles en determinar la recidiva temprana, un estadiage clínico más preciso y las llamadas tasas moleculares de remisión, ya que son más sensibles que la evaluación citológica estándar para la sangre periférica, la médula ósea y los nódulos linfáticos (Vail y Young, 2009).

2.8.6. Inmunofenotipo

Por una identificación minuciosa del inmunofenotipo, son aplicados anticuerpos contra marcadores de linfocitos en las secciones del tejido (inmunohistoquímica), especímenes citológicos (inmunocitoquímica) o en las células individuales en un medio fluido (citometría de flujo) (Vail y Young, 2009).

El inmunofenotipo de un linfocito se identifica mediante la determinación de moléculas específicas para las células B (p. ej. CD79a) y células T (p. ej. CD3). Aunque las células tumorales a veces tienen características morfológicas que tipifican un inmunofenotipo

particular, pueden ocurrir excepciones y por lo tanto, la morfología no podrá ser usada como único determinante del tipo linfocito (Coyle *et al.*, 2004).

Es factible la evaluación a través de citometría de flujo de los aspirados a través de aguja, para las células T, los marcadores incluyen CD3 (pan T), CD4 (helper T) y CD8 (cytotoxic T); y para las células B, los marcadores son CD79a y CD21 (Moore *et al.*, 1995).

Se ha reportado la comunicación de la expresión aberrante de moléculas CD en el linfoma canino. En un estudio de 59 perros con linfoma, las células tumorales de seis perros fueron positivas para los marcadores CD de células T y B; sin embargo un ensayo de clonación reveló clonación de células T o del receptor de inmunoglobulinas pero no de ambos, esto indica que en algunos casos de linfoma de células B y T, las células malignas pueden coexpresar marcadores CD de células B y T (Wilkerson *et al.*, 2005). Los anticuerpos contra estas moléculas son usados para determinar el inmunofenotipo; sin embargo, también tienen un potencial uso como modalidad terapéutica si las células tumorales pueden ser bombardeadas usando estos anticuerpos (Vail y Young, 2009).

La inmunohistoquímica representa una herramienta importante en la identificación de la línea celular del linfoma, además es importante para diferenciar procesos reactivos de procesos neoplásicos como es el caso de la hiperplasia folicular atípica del linfoma folicular y tiene la ventaja de poder evaluar la arquitectura ganglionar (Naranjo, 2000). Además, la inmunohistoquímica puede establecer si el tipo de linfoma se origina a partir de linfocitos B o linfocitos T, este conocimiento puede ser usado para designar un tratamiento y pronóstico de caninos que padecen linfoma (McGavin, 2006), en algunos casos es útil para determinar el diagnóstico del linfoma (Vail y Young, 2009).

Una ventaja adicional de la inmunohistoquímica es que nos permite establecer los diferentes tipos de linfoma de Hodgkin, así como diferenciar lesiones infiltrativas leucémicas de linfomas (Naranjo, 2000). La utilidad de los estudios inmunofenotípicos en la práctica cotidiana se refleja en diversos apartados de diferente índole, el índice de sospecha de linfoma para tumores con características atípicas se ha incrementado notablemente y, el amplio espectro de apariencias morfológicas de los linfomas de células grandes justifica la inclusión de marcadores linfoides en el estudio inmunofenotípico de un tumor de estirpe celular incierta (Harris, 1997; Frizzera *et al.*, 1999).

El estudio del inmunofenotipo mejora la eficacia del diagnóstico entre un 10% y un 45% para los tipos más frecuentes del linfoma. El estudio combinado del fenotipo y genotipo de los linfomas no Hodgkin, ha permitido la identificación de varios tipos de linfoma no reconocidos con anterioridad, entre los que se incluyen linfoma de células del manto, linfoma de células B monocitoide, linfoma extranodal de tipo MALT, linfoma esplénico de zona marginal, linfoma B de células grandes esclerosante mediastínico y una variedad de linfomas de células T, incluyendo el linfoma de células grandes anaplásico (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

El diagnóstico de algunos subtipos de linfoma, se ve escasamente mejorado con el estudio del inmunofenotipo, entre las que se encuentran el linfoma folicular, linfoma de zona marginal de tipo MALT, linfoma linfocítico y linfoma de Hodgkin. Otras, sin embargo, ven su reconocimiento, mejorado hasta en un 45%, como es el caso de linfoma de células del manto, linfoma difuso de células grandes y linfomas T, es decir, exactamente aquellos que presentan una mayor agresividad clínica del conjunto total de linfomas (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997).

2.8.6.1. PCR del reacomodamiento del receptor antigénico (PARR)

El PCR se utiliza para identificar los reordenamientos del antígeno receptor (PARR) para determinar la expansión monoclonal de linfocitos (Von Euler, 2004). La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser utilizada para distinguir linfoma o leucemias de procesos reactivos, utilizando muestras de aspirados como sangre (en el caso de leucemias) o tejido apropiadamente fijado en formalina (Alvarez, 2011).

Ocasionalmente el diagnóstico del linfoma y la diferenciación de una proliferación de linfocitos malignos frente a otros benignos no es posible basándose en los criterios estándar histológicos y citológicos, en estos casos, son necesarios avanzados análisis moleculares para ayudar a la confirmación de un diagnóstico. La clonación es la marca de la malignidad; es decir, la población de células malignas teóricamente debería ser una derivación de un único clon maligno caracterizado por una particular región de ADN propia de este tumor, por ejemplo, en un perro con linfoma de células T, todas las células malignas deberían tener la misma secuencia de ADN para la región variable del gen receptor de las células T (TCR); asimismo, en un perro con linfoma de células B, las células tumorales deberían tener idéntica secuencia en la región

variable del gen receptor de inmunoglobulonas. A la inversa, en las linfocitosis reactivas, las células son policlonales para sus receptores de antígenos (Vail y Young, 2009)

Este análisis es relativamente nuevo, y es especialmente útil cuando se trata de discriminar hiperplasia atípica de linfoma en estadio temprano, así como el seguimiento de la remisión de la enfermedad o de las células tumorales circulantes en la sangre periférica. Intrínsecamente, es más sensible que la microscopía tradicional (citología o histopatología), los límites de detección se citan como un clon neoplásico en 100 linfocitos heterogéneos no neoplásicos (Burnett *et al*, 2003). Se pueden dar raramente falsos positivos en ciertos casos como Ehrlichia y Leishmania, y falsos negativos por falta de especificidad para cada cebador de reordenamiento del gen posible (Vail y Young, 2009). En estos casos el diagnóstico debería de ser realizado tras los resultados de todos los test diagnósticos considerados, incluyendo la evaluación histológica y citológica, el inmunofenotipo y los estudios de clonación en conjunto con las características del animal y los hallazgos físicos. El análisis PARR se puede realizar con material fresco o fijado, obtenido a través de biopsia o aspiración, actualmente dicha técnica sólo está disponible en Estados Unidos (Von Euler, 2004).

2.8.6.2. Timidina quinasa (TK)

Varios marcadores bioquímicos, tales como la glicoproteína ácida y alfa fetoproteína se han utilizado para detectar y vigilar el linfoma en caninos, estos han obtenido una falta de especificidad, con relación a otras enfermedades inflamatorias y neoplásicas, en las cuales también existe una elevación de los niveles de estos marcadores bioquímicos, por lo que no se ha empleado un uso clínico generalizado (Lana, 2006), otros marcadores en investigación son zinc, cromo hierro y endostatina (Grindem *et al.*, 1994).

La timidina quinasa, es una enzima citoplasmática que cataliza la fosforilación de la timidina a la timidina monofosfato (Llobell, 1989). Existen dos formas, mitocondrial y citosólica. La timidina quinasa, es esencialmente un marcador del ciclo y la proliferación celular, por lo que en el caso del linfoma, la reducción o aumento de sus niveles puede ser utilizado para controlar la remisión o no de la enfermedad y la respuesta terapéutica, sin embargo, algunos linfomas como los de bajo grado no manifiestan tales elevaciones y además hay que tener en cuenta que pueden presentarse niveles altos en una marcada hiperplasia reactiva, generando falsos positivos (Lana, 2006).

2.8.7. Métodos de diagnóstico por imágenes: Radiografía -Ecografía - Tomografía Axial Computarizada – Resonancia Magnética

Cada modalidad tiene ventajas y desventajas con respecto al costo, disponibilidad, sensibilidad, especificidad, y la calidad de las imágenes anatómicas versus las imágenes funcionales. En general, los estudios por imagen no aportan resultados específicos, pero si ayudan a determinar la extensión de la enfermedad y el compromiso con las estructuras vecinas (Forrest, 2007). De acuerdo con Vail y Ogilvie (2003), la ecografía y la radiografía son útiles para la clasificación o determinar la extensión de la neoplasia.

La radiografía torácica, es de importancia para identificar masas torácicas por linfoma mediastinal y se recomienda para cualquier perro con hipercalcemia de etiología desconocida (Ann, 1994). Estas masas mediastinales anteriores, corresponden a nódulos linfáticos, pero deben distinguirse de los nódulos linfáticos hiliares y esternales, además se debe tener en cuenta que el 50% de los caninos con masas mediastinales anteriores, presentan hipercalcemia. Radiográficamente, se debe diferenciar el infiltrado intersticial del linfoma de enfermedades infecciosas e inflamatorias como la micosis pulmonar (Ann, 1994). Couto (2001), afirma que el linfoma multicéntrico presenta cambios radiográficos que incluyen linfadenopatía esternal o traqueobronquial, infiltrado pulmonar intersticial, broncoalveolar o mixto como también derrame pleural (Fig. 8).

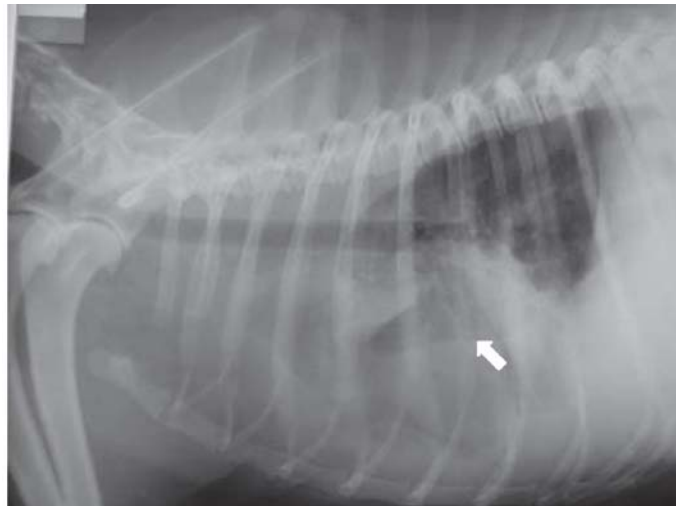


Figura 8. Linfoma craneomediastinal (flecha) en radiografía. Labrador que tenía derrame pleural.

La radiografía abdominal, puede identificar esplenomegalia, hepatomegalia, nódulos linfáticos aumentados de tamaño. En algunos casos, puede haber agrandamiento renal (Gear, 2009). La radiografía de contraste debe ser realizada en perros con sospecha de linfoma intestinal, los cuales presenten signos de enfermedad gastrointestinal por un periodo largo, y que en el examen puede sugerir cambios en la mucosa como engrosamiento irregular, lo que revela enfermedad infiltrativa (Couto, 1992).

La ecografía abdominal, puede ayudar a identificar órganos involucrados, así como la dilatación de los vasos linfáticos abdominales (Ann, 1994). Mediante este examen se puede revelar linfadenopatía intra-abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, renomegalia con o sin irregularidades, agrandamiento del linfonódulo sublumbar y presencia de masas intra-abdominales, de este modo, mediante una biopsia aspirativa guiada, el hígado y bazo pueden ser aspirados para realizarles un examen citológico (Rosciari, 1994). El tracto gastrointestinal, es evaluado especialmente para casos de linfomas gastrointestinales primarios que suelen presentarse como masas multifocales. La ecografía, también puede revelar la pérdida de las capas intestinales y engrosamiento intestinal (Couto, 1992). La formación de imágenes se puede utilizar para comprobar el agrandamiento de órganos y masas, y puede ayudar a concluir un diagnóstico o la etapa en la que el paciente se encuentra (Ann, 1994).

La Tomografía Axial Computarizada, es un método eficaz para el estudio de las masas de tejidos blandos producidas por múltiples causas, este método de diagnóstico por imagen es útil para casos con la forma neurológica de linfoma, cuya localización más común en el sistema nervioso central (SNC) es a nivel medular-extramedular, aunque también puede verse situado a nivel intramedular – extramedular (Raurell, 1998).

La Resonancia Magnética, es considerada como método de elección para la detección, localización y caracterización de las masas de tejido blando. Se ha demostrado su utilidad para ubicar lesiones a nivel de SNC (lesiones intracraneales y extracraneales). Aunque este método de diagnóstico no es específico, cuando se combina con la historia y los signos neurológicos, los hallazgos de la resonancia magnética ayudan a un diagnóstico presuntivo que debería ser confirmado por citología o histopatología (Palus, 2012).

2.8.8. Evaluación de la médula ósea

Un aspirado o biopsia de la médula ósea (del húmero proximal o de la cresta ilíaca) está indicado para un completo estadiage y en perros con anemia, linfocitosis, atipia en los linfocitos periféricos u otra citopenia periférica. En un estudio de 53 perros con linfoma, el 28% tuvo células malignas circulantes y fueron considerados leucémicos, mientras que la exploración de la médula ósea indicó afectación en el 57% (Vail y Young, 2009).

2.9. Estadificación

Una vez que se ha diagnosticado y clasificado la neoplasia, para planificar el tratamiento de la misma, se debe realizar una serie de pruebas clínicas para saber si las células tumorales se han extendido a otras partes del cuerpo. La evaluación de la extensión de la enfermedad es crítica, ya que la terapia y el pronóstico dependen del grado en el que la masa se haya expandido más allá del lugar primario. A este conjunto de pruebas se les llama estadificación o estudio de extensión conocido comúnmente como TNM (Tumor primario, nódulo, metástasis) (Morris y Dobson, 2001).

La clasificación clínica de los linfomas fue propuesta por la Organización Mundial de la Salud en 1980 y establece cinco etapas de la neoplasia, en la que la primera, sólo afecta a un solo nódulo linfático y en la etapa más avanzada, compromete a la médula ósea del paciente y por lo tanto, tiene mal pronóstico. En el año 2001, la OMS realizó una gradación en base a la ubicación primaria de la neoplasia y sus metástasis (Cuadro 2) incluyendo una subgradación en cada una de ellas, que es la presentación o no de signos clínicos (Alvarez, 2001).

CUADRO N°02 Estadificación clínica de la Organización Mundial de la Salud para linfoma (OMS)

<p>Localización anatómica</p> <p>A. Generalizada</p> <p>B. Alimentario</p> <p>C. Tímico</p> <p>D. Piel</p> <p>E. Leucemia(Verdadero)*</p> <p>F. Otros (Tumores renales solitarios inclusive)</p> <p>Estadíos (inclusive localizaciones anatómicas)</p> <p>I. Afectación limitada a un simple nódulo o tejido en un simple órgano</p> <p>Ia. Estadío I sin signos sistémicos</p> <p>Ib. Estadío I con signos sistémicos</p> <p>II. Afectación de algunos nódulos linfáticos en un área regional (con o sin afectación de las tonsilas).</p>	<p>IIa. Estadío II sin signos sistémicos</p> <p>IIb. Estadío II con signos sistémicos</p> <p>III. Afectación generalizada de los nódulos linfáticos.</p> <p>IIIa. Estadío III sin signos sistémicos</p> <p>IIIb. Estadío III con signos sistémicos</p> <p>IV. Afectación del hígado y bazo (con o sin estadío III de enfermedad)</p> <p>IVa. Estadío IV sin signos sistémicos</p> <p>IVb. Estadío IV con signos sistémicos</p> <p>V. Manifestación en la sangre y afectación de la médula ósea y/u orgánicos</p> <p>Otros sistemas (con o sin la de los estadíos I a IV de la enfermedad linfoide)</p> <p>Va. Estadío V sin signos sistémicos</p> <p>Vb. Estadío V sin signos sistémicos</p>
---	---

Fuente: Vail y Young (2009)

La mayor diferencia entre la especie humana y canina es que en la mayoría de los casos (80%), los perros ya están en una etapa avanzada de la enfermedad (estadío III, IV y V) durante la evaluación física (Vail y Young, 2009), por lo que se presume que los estadíos I y II son inadvertidos por los propietarios (Vail y Young, 2007). El linfoma canino, tiene algunas similitudes con respecto al linfoma no Hodgkin (LNH) que afecta a los seres humanos con respecto a la etiología, la epidemiología, presentación clínica, la morfología y el fenotipo (Kiupel, 1999). Por lo tanto, algunas clasificaciones creadas por los seres humanos son aplicables a los linfomas en los perros.

El grado para el cual se debe realizar un cuidadoso estadiage depende de tres factores, si el resultado alterará el plan de tratamiento, si proporcionará importante información pronóstica y si el cliente precisa saberlo, además, cuando se comparan diferentes protocolos respecto a su eficacia, deberían ser utilizados sistemas de estadiage consistentes y similares para evitar el llamado estadio migratorio, el cual resulta cuando una metodología de estadiage es más precisa que otra (Bunt *et al.*, 1995).

2.9.1. Clasificación por estados TNM

Un sistema de clasificación más utilizado de estadios modificados al pretratamiento, es el que hace referencia al tumor o tamaño tumoral primario (T), a la afectación de linfonódulos regionales (N) y a la presencia de diseminación a distancia del tumor primario o metástasis en el lugar de origen (Cuadro 3) conocido por las siglas TNM. Esta clasificación evalúa las propiedades intrínsecas del tumor, y ha demostrado un gran valor predictivo de la evolución de los pacientes (Pappo *et al.*, 1997).

CUADRO N° 03 Sistema de clasificación TNM propuesto para los tumores cutáneos de linfomas

Tumor primario		
To- Neoplasia primaria no evidente		
T1- Menos que 1 cm, Móvil		
T2- 1-3 cm de diámetro, no profundamente adherido		
T3- 3-5 cm de diámetro, parcialmente fijado a las estructuras subyacentes		
T4 - >5 cm de diámetro, invadiendo estructuras más profundas		
Linfonódulos regionales		
No- Tamaño y consistencia normales, palpables		
N1- Aumentados, firmes (ipsilaterales)		
N2- Fijados a los tejidos circundantes		
N3- Afectación de los linfonódulos más allá del primer estadio		
Metástasis distante		
Mo- Sin evidencia de metástasis		
M1- Metastásis visceral aislada		
M2- Múltiples metástasis viscerales		
Designación de estadios		
I. T1	No	Mo
T2	No	Mo
II. To, 1 o 2	N1	Mo
T3	No	Mo
III. T3	N1	Mo
T3	No	Mo
IV. Cualquier T	N2	Mo
Cualquier T	N3	Mo
Cualquier T	Cualquier N	M1 ó M2

Fuente: Crow (1992).

T: Tumor primario

T1: Parches eccematosos, pápulas o placas limitadas que cubren menos de 10% de la superficie de la piel

T2: Parches eritematosos, pápulas o placas generalizadas que cubren 10% o más de la superficie de la piel

T3: Tumores, uno o más

T4: Eritrodermia generalizada

Complicación ganglionar (N):

N0: No hay linfonódulo periférico con anomalía clínica, patología negativa de linfoma cutáneo de células T

N1: Linfonódulos periféricos con anomalía clínica, patología negativa de linfoma cutáneo de células T

N2: Ningún linfonódulo periférico con anomalía clínica, patología positiva de linfoma cutáneo de células T

N3: Linfonódulos periféricos con anomalía clínica, patología positiva de linfoma cutáneo de células T

Metástasis distante (M):

M0: No hay complicación de órganos viscerales.

M1: Complicación visceral (debe tener confirmación de patología; se debe especificar el órgano afectado)

2.10. Tratamiento

La mayoría de los animales con linfoma, que no han recibido tratamiento, viven de 1 - 2 semanas en promedio (Couto, 2001). La quimioterapia es el tratamiento preferido para el linfoma, así mismo Vail y Ogilvie (2003) indican que con un tratamiento de quimioterapia, 75% a 90% de los perros y gatos presentan remisión de la enfermedad y pueden sobrevivir un promedio de 9 a 12 meses, con una calidad de vida satisfactoria. Varios protocolos quimioterapéuticos son indicados en la terapia del linfoma canino, muchos de los cuales pueden ser formulados con la utilización de un fármaco o una combinación de ellos, los protocolos con combinaciones de fármacos poseen mejores resultados en la obtención de remisión completa de la enfermedad, asociado a un mayor tiempo de vida libre de enfermedad y una mejor calidad de vida. Cuanto mayor es el número de fármacos utilizados, mayor será el costo y mejor será la

eficiencia en el tratamiento, sin embargo, mayores serán las posibilidades de efectos adversos (McEwen y Young, 1996).

La mayoría de los protocolos, utilizan diferentes combinaciones con fármacos tales como ciclofosfamida, Oncovin (vincristina), hydroxydaunorubicin (doxorubicin), prednisona (CHOP). Otros fármacos como L- aspargin, el clorambucil, actinomicina D, citarabina, metotrexato y mitoxantrona también son descritos en algunos protocolos quimioterapeúticos para el linfoma canino (Moreno, 2005).

Daters *et al.* (2009), realizaron una evaluación de un protocolo quimioterápico multidrogas (CHOP) con respecto a un protocolo combinado de doxorubicina y mitoxantrone, concluyendo que hubo un incremento en el tiempo de remisión en perros con linfoma multicéntrico que fueron tratados con doxorubicina y mitoxantrone comparado con el protocolo tradicional CHOP.

La cirugía como parte de la terapia en caninos con linfoma, es controversial, en la mayoría de los casos, la enfermedad es multicéntrica no habiendo indicación quirúrgica, pero sí de quimioterapia (Moreno, 2005). En el caso de una masa tumoral única, la cirugía puede auxiliar la quimioterapia, pero no podrá ser la única forma de tratamiento, debiendo estar asociada a la quimioterapia. En la presentación del linfoma alimentario, el procedimiento quirúrgico solamente será obligatorio, cuando hubiese obliteración de la luz del tracto digestivo (McEwen y Young, 1996), si el tumor se encuentra de manera localizada y puede ser removida quirúrgicamente, el tratamiento debe ser combinado, obteniéndose resultados idóneos, aunque los tiempos de supervivencia son más cortos que la presentación multicéntrica. En la presentación difusa se utiliza la quimioterapia combinada, pero los resultados por lo general no son tan favorables, especialmente en el linfoma gástrico (Alvarez, 2001).

La radioterapia puede ser usada en la terapia del linfoma canino, siendo indicado en el tratamiento de animales que desarrollaron linfoma confinado a una única ubicación (Mauldin y Meleo, 1997), como es en los casos de linfoma nasal y con el compromiso del sistema nervioso central (McEwen y Young, 1996). Existen dos situaciones en la que la radiación ionizante puede ser utilizada, la primera es su utilización conjunta con la quimioterapia para mejorar la probabilidad de una rápida reducción, y la segunda corresponde al uso en aquellos casos donde la neoplasia es resistente a la quimioterapia (Mauldin y Meleo, 1997).

El tratamiento del linfoma cutáneo primario, pocas veces es exitoso, en caso de ser secundario al linfoma multicéntrico, la respuesta es más favorable. En el caso de linfoma cutáneo primario, la mayoría de tratamientos deben ser considerados paliativos, pero al aliviar algunos signos clínicos, en medicina humana, se utilizan diversos fármacos específicos para tratar este tipo de linfoma (Moreno-Ramirez, 2003), las lesiones localizadas deben ser tratadas por medio de cirugía o radioterapia (Alvarez, 2001).

2.11. Pronóstico

2.11.1. Indicadores de pronóstico

Determinar el pronóstico en perros con linfoma es difícil, el diagnóstico temprano influye de un modo positivo para el pronóstico y la realización de un tratamiento oportuno (Vail y Young, 2009). Cada caso debe considerarse de forma individual, con la ayuda de una buena evaluación clínica, y seguido de una serie de pruebas de laboratorio (Couto, 2001).

El pronóstico del linfoma canino varía y depende de un número de factores, como es la localización de la enfermedad, la extensión de la enfermedad (el estadio clínico), la presencia o ausencia de signos clínicos (el subestadio), el grado histológico, el inmunofenotipo (células T o B), exposición previa a la quimioterapia o corticoides, alteración en los procesos de muerte celular (apoptosis), la tasa de proliferación del tumor, la presencia de problemas médicos concurrentes o condiciones paraneoplásicas (p. ej. hipercalcemia, pérdida de peso e insuficiencia hepática) y posiblemente del sexo (Vail y Young, 2009). Aunque el linfoma canino es raramente curable (menos del 10% de los casos), son típicas las respuestas completas y buena calidad de vida durante las remisiones y supervivencias extendidas (Valli, 2007).

Los factores que determinan el pronóstico del linfoma canino son múltiples (Cuadro 4), los factores de mayor importancia son el inmunofenotipo y el subestadio OMS (Keller *et al.*, 1993; Vail *et al.*, 1996). Algunas descripciones han confirmado que los perros con tumores inmunorreactivos (p. ej. los derivados de células T) están asociados con una duración de la remisión y de la supervivencia significativamente más cortas (Vail *et al.*, 1996; Steinberg *et al.*, 1995). Esto es cierto principalmente para los perros con linfoma multicéntrico, por que el inmunofenotipo de las formas solitarios o extranodales del linfoma no han sido minuciosamente investigadas con respecto al pronóstico (MacEwen *et al.*, 1981; Starrak *et al.*, 1997).

Además se ha visto que los perros con linfoma de células B que expresan menores niveles de los antígenos B5 (expresado en el 95% de los linfocitos no neoplásicos) también experimentan una menor remisión y más corta duración de supervivencia (Ruslander *et al.*, 1997). Los perros con subestadio OMS de enfermedad b (p. ej. clínicamente enfermo) también tienen peor pronóstico comparado con los perros con subestadio OMS de enfermedad a (Keller *et al.*, 1993; Vail *et al.*, 1996).

CUADRO N° 04 Factores pronóstico para el Linfoma en caninos

Factor	Gran Asociación	Modesta Asociación	Comentarios
Estadiage clínica World Health Organization (OMS)		X	Estadío VII: Favorable Estadío V con afectación significativa de la medula ósea Desfavorable
Subestadiage clínica OMS		X	Subestadío b (Clínicamente enfermo) asociado a reducción de la supervivencia
Histopatología		X	Grado alto/medio asociado alta tasa de respuesta pero reducida supervivencia.
Inmunofenotipo	X		Fenotipo de células T asociado con reducida supervivencia
Hipercalcemia		X	Factor negativo si se asocia con tipo de células T y función renal reducida
Género		X	Algunos estudios sugieren que las hembras tienen pronóstico favorable.
Medidas de proliferación		X	Los estudios son contradictorios
Pretratamiento de prolongado con esteroides	X		La mayoría de los estudios sugieren que el uso previo de esteroides acorta la duración de la respuesta, pero
Expresión de glicoproteína – P		X	Puede estar asociada con una peor tasa de respuesta y acorta la remisión
Linfoadenopatía craneomediastínica	X		Una gran recopilación de casos comunican remisión y supervivencia más cortas
Localización anatómica	X		Leucemia, las formas difusas cutáneas y alimentarias y hepatoesplénica se asocian con un pronóstico desfavorable.
Enzimas marcadores circulantes		X	Los niveles de glutatión –S-transferasa y timidina quinasa han sido descritos como predictores, pero los resultados requieren confirmación
Niveles séricos de VEGF		X	Pequeños estudios sugieren que los niveles pretratamientos son predictivos de duración de remisión
Historia de enfermedad inflamatorio crónica		X	Predice la probabilidad de recidiva temprana.

Fuente: Vail y Young (2009).

Los perros con estadio de enfermedad I o II tienen mejor pronóstico que aquellos de enfermedad más avanzada (estadios III, IV o V). En algunos estudios, un elevado nivel de calcio sérico (por encima de 11,9 mg/dl) ha demostrado ser un factor de pronóstico negativo

(Greenlee *et al.*, 1990; Weller *et al.*, 1982); sin embargo, rara vez suele ser verdad con análisis multivariados ya que la hipercalcemia se asocia al fenotipo de las células T (Vail y Young, 2009).

Se ha visto en algunos estudios que el tipo histológico influencia el pronóstico, es así que Valli (2013) determina una probabilidad de supervivencia de 163 días para el linfoma de la zona T y 63 días para el linfoma de células T periférico inespecífico. Los perros con linfoma clasificado como intermedio o de alto grado (grandes células, Centrobástico e inmunoblastico) tienden a responder a la quimioterapia pero puede recaer pronto. Los perros con linfomas de bajo grado (pequeñas linfocítico o centrocítico) tienen una menor tasa de respuesta a la quimioterapia, pero aun así tienen una ventaja en la supervivencia sobre los perros con linfomas de grado intermedio o alto en los que el curso de la enfermedad sea quizás sea más indolente (Teske *et al.*, 1994). Usando la Working Formulation, los perros con linfomas de bajo grado tienen una ventaja de supervivencia comparado con los perros con tumores de grado intermedio o alto grado (Shadduck *et al.*, 1978).

Recientemente, las pruebas que proliferan (p. ej. análisis de la respuesta a la bromodeoxyuridina (BrdU), reactividad al anticuerpo Ki-67 e índices AgNOR) para medir la actividad proliferativa de las células tumorales han demostrado que proporcionan información pronóstica significativa en perros tratados con quimioterapias de combinación (Vail *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 2000). En otros estudios, los grupos de tumores de baja proliferación fueron asociados con un mejor pronóstico (Kiupel *et al.*, 1998; Larue *et al.*, 1999). En otro estudio, la proporción de células tumorales que experimentaron apoptosis fue modestamente predictiva de duración de remisión (Phillips *et al.*, 2000).

La localización anatómica de la enfermedad también tiene una considerable importancia pronóstica (Vail y Young, 2009). Los linfomas que tienden a estar asociados con un peor pronóstico son el cutáneo difuso primario, gastrointestinal difuso, hepatoesplénico y primario de SNC. El linfoma cutáneo tiende a progresar lentamente y las respuestas a la quimioterapia sistémica son menos duraderas, los linfomas localizados en la piel pueden ser controlados mediante radioterapia o cirugía o ambos, y estos tumores tienen un mejor pronóstico (Vail y Young, 2009). En algunos perros con linfoma está presente una significativa afectación de la médula ósea (p. ej. las células tumorales afectan a más del 50% de todas las células nucleadas) y pueden estar presentes en la sangre periférica linfocitos malignos circulantes. Estos perros tienden a tener un pronóstico general malo, en algunos casos esto es difícil de determinar

cuando la enfermedad se origina desde la médula ósea (p. ej. leucemia linfoblástica aguda) o es un linfoma difuso con afectación extensiva en la médula. El inmunofenotipo en la leucemia linfoblástica aguda son típicamente CD34 positivo, sin embargo, el pronóstico es malo cuando hay citopenia (Vail y Young, 2009).

En cuanto, al género ha demostrado tener influencia en el pronóstico en algunos estudios (Moulton y Harvey, 1990; Thomas *et al.*, 2003). Las hembras esterilizadas tienden a tener mejor pronóstico, los machos tienen mayor incidencia de fenotipo de células T, las cuales quizás llevan a un peor pronóstico (Vail *et al.*, 1996).

Otros biomarcadores potenciales descritos en el pronóstico, incluyen los niveles circulantes de glutatión – S- transferasa, timidina quinasa y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Von Euler *et al.*, 2004; Gentilini *et al.*, 2005). Una publicación sugiere que una historia de enfermedad inflamatoria crónica de diversos tipos predice una probabilidad de recidiva temprana (Baskin *et al.*, 2000). Estos indicadores de pronóstico putativos requieren confirmación en grandes estudios (Vail y Young, 2009).

El pronóstico para linfomas craneomediastinal y gastrointestinal, es malo, a menudo tienen un tiempo de vida menos de tres meses (Frank, 2007). Estas neoplasias tienen una mala respuesta inicial al tratamiento y pocos casos logran remisión, cuya duración es corta, sin embargo, linfomas colorrectales pueden tener un mejor pronóstico (Frank, 2007). Los linfomas cutáneos en general no responden bien a la quimioterapia, pero el curso de la enfermedad puede ser prolongada. Los perros con linfomas cuyo estadiaje es V, basado en el sistema de clasificación clínica de la OMS, tienen un mal pronóstico, al igual que animales con linfoma subestadio b. El inmunofenotipo de linfomas de células T, también está asociado a un mal pronóstico. Muchos factores parecen tener un efecto modesto sobre el pronóstico (Gear, 2009).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Lugar de estudio:

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria – Sección Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LHEPV-FMV UNMSM).

3.1.2. Materiales

- 1778 Informes histopatológicos de neoplasias caninas desde el año 1996 hasta el 2012.
- 16 Láminas diagnosticadas con Linfoma canino
- Microscopio Nikon Eclipse E 100
- Cámara fotográfica Nikon
- Material de cómputo y escritorio

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Tamaño muestral

Se realizó la revisión de 1778 informes con diagnóstico histopatológico de neoplasias caninas desde el 2 de enero de 1996 hasta el 21 de diciembre del 2012. Se seleccionaron 49 informes con diagnóstico de linfoma canino mediante histopatología, hallándose solamente 16 láminas aptas para la clasificación histopatológica. Sin embargo, se observaron además 130 informes con diagnóstico de linfoma canino mediante citología.

3.2.2. Manejo de variables

3.2.2.1. Clasificación Histopatológica

Se realizó la revisión de los informes histopatológicos desde el año 1996 hasta el 2012 y se colectaron las láminas histopatológicas que se diagnosticaron como linfoma canino (16) en el periodo establecido de búsqueda. Obtenidas dichas láminas, se procedió a realizar la clasificación histopatológica de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud y adaptada por Valli y Caswell (2002), observándose mediante un microscopio óptico y a un aumento de 100x para evaluar el patrón (nodular o difuso), integridad de la capsula del parénquima e infiltración de tejidos adyacentes. Mediante un aumento de 400x y 1000x se evaluó el tamaño celular en relación al tamaño de glóbulos rojos, características celulares (características citoplasmáticas, características nucleares, patrón de cromatina), índice mitótico y características tisulares indicativas de posibles tipos de linfoma (Cuadro 5 y 6).

3.2.2.2. Criterios de selección de la clasificación histopatológica de tipos de linfoma canino de acuerdo a la OMS

a) Patrón

Microscópicamente, la arquitectura puede ser alterada total o parcialmente, siendo la corteza y la médula indistinguibles. La cápsula puede estar infiltrada y ocasionalmente fragmentada. A nivel central de los ganglios linfáticos puede encontrarse hemorrágico acompañado o no de focos necróticos. Hay dos tipos de proliferaciones que son microscópicamente reconocidas: difuso y folicular (Baba, 2007).

La forma difusa se caracteriza por la aparición de células tumorales proliferando en la zona cortical o paracortical. En las formas avanzadas, la proliferación se extiende a los ganglios linfáticos, induciendo a la atrofia y la desaparición de los folículos linfoides y a la

desorganización de las estructuras histológicas normales que ya no pueden ser reconocidas (Baba, 2007).

El patrón folicular o nodular se presenta al inicio de la proliferación; los senos marginales, paracorticales y áreas medulares son destruidos gradualmente y, finalmente, se produce la infiltración de la cápsula. Este patrón folicular parece estar asociada con lesiones gastrointestinales o a la forma multicéntrica. El bazo es constantemente hipertrofiado, y al corte se observa macroscópicamente manchas heterogéneas de color blanquecino grisáceo en la pulpa roja (Baba, 2007).

Microscópicamente, en las formas iniciales, las formaciones linfoides se ven afectadas y, posteriormente, invaden el parénquima, lo que resulta en la desaparición de los cordones y senos marginales. La infiltración tumoral puede ser lineal difusa, periarteriolar a la pulpa blanca, o multifocal peritrabecular y periarteriolar (Baba, 2007).

b) Tamaño celular

El tamaño celular fue considerado en tres niveles de acuerdo a la relación del tamaño del diámetro del glóbulo rojo.

- Pequeño 1 – 1.25 G.R
- Mediano > 1.25 G.R - 2
- Grande > 2 G.R

c) Características celulares

Las características celulares del citoplasma y el núcleo son consideradas para el diagnóstico histopatológico. Se consideran características citoplasmáticas tales como, abundante, moderado, escaso, vacuolado, ligeramente teñido, márgenes celulares distinguibles, presencia de “boundaries”, “squaring – off” y características nucleares como núcleo voluminoso, pequeño, excéntrico, redondo, elongado, irregular, sombreado, anisocariosis, poiquilocariosis, cromatina densa, dispersa o periférica, nucléolo inaparente, simple, oscuro, único, ausente o tenue, nucléolos múltiples y prominentes, rodeando la membrana nuclear, membrana nuclear gruesa, presencia o ausencia de indentaciones nucleares, binucleación.

d) Índice mitótico

Índice mitótico que se estima como bajo es de 0-2 mitosis por campo microscópico, moderado entre 3-5 mitosis, y alto en el caso de 6 a más células en mitosis observadas con una magnificación de 400x.

e) Características tisulares

Las características tisulares para cada tipo de linfoma son indicadas en los cuadros 5 y 6.

3.2.2.3. Consideraciones generales incluidas.-

a) Raza.-

Se consideraron las siguientes razas:

- a. Raza pura
- b. Raza cruzada**

b) Edad.-

Se consideraron animales desde 0 – 15 años, teniendo en cuenta la casuística del LHEPV-FMV-UNMSM).

- a. Caninos de edad 0 años – 5 años.
- b. Caninos de 6 años – 10 años
- c. Caninos de 11 años – 15 años

c) Sexo.-

Se consideraron:

- a. Macho
- b. Hembra

d) Localización de la neoplasia a nivel corporal.-

- a. Linfonódulos:
 - a.1. Linfonódulos externos: Submandibulares
 - a.2. Linfonódulos internos: Mesentéricos
- b. Órganos viscerales
 - b.1. Hígado
 - b.2. Bazo
 - b.3. Intestino
- c. Mucosas
 - c.1. Labial

3.3. ANALISIS DE DATOS

- La clasificación histopatológica de linfomas caninos provenientes de los informes histopatológicos del LHEPV-FMV-UNMSM durante el periodo 1996-2012 se obtuvo mediante el método descriptivo, siguiendo los criterios de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de sólo 16 casos (16/49).
- Se realizó el análisis de frecuencia para la determinación de los tipos de linfoma canino (Cuadro 7).

$$\text{Frecuencia de tipo de Linfoma Canino \%} = \frac{\text{Tipo de linfoma canino}}{\text{Total de tipos de linfomas canino}} \times 100$$

- Se resumieron los cuadros de los tipos histológicos con sus respectivos datos (raza, sexo, edad y localización) (Cuadro 8).
- Se realizó el análisis de frecuencia de los datos obtenidos de los 49 informes histopatológicos con respecto al total de neoplasias caninas, edad, sexo, raza y localización, además se utilizaron los datos de los informes de diagnóstico citológico para determinar la frecuencia de la localización del linfoma. Estos resultados fueron colocados en Anexos (Anexos 2-9)

IV. RESULTADOS

Se realizó la clasificación histológica de tipos de linfoma canino de acuerdo a los criterios de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 16 casos obtenidos de los informes histopatológicos del Laboratorio HEPV. Se clasificaron 6 tipos (Cuadro N° 07 y 08): linfoma de células B grande difuso (Fig. 09, 10 y 11) 7/16 (43.75%), linfoma de células del Manto (Fig. 12 y 13) 3/16 (18.75%), linfoma linfoblástico (Fig. 14) 2/16 (12.50%), linfoma periférico de células T cutáneo no epiteliotrópico (Fig. 15) 2/16 (12.50%), linfoma anaplásico de células grandes (Fig. 16) 1/16 (6.25%), linfoma de células T Micosis fungoides (Fig. 17,18 y 19) 1/16 (6.25%). El linfoma de células B grande difuso fue el tipo de mayor presentación, determinándose tres subtipos (imunoblástico (Fig. 09) 4/16 (25.00%), centroblástico (Fig. 10) 2/16 (12.50%) y rico en células T (Fig. 11) 1/16 (6.25%)).

El Linfoma difuso de células B grandes inmunoblástico se caracteriza por presentar un patrón difuso, observándose células con citoplasma variable, presencia de nucléolo central y prominente, patrón de cromatina definida (Fig. 9), tamaño celular de dos veces mayor del diámetro de un glóbulo rojo.

V. DISCUSION

El linfoma canino es una neoplasia hematopoyética que abarca diversos tipos histológicos, dividiéndose en diferentes entidades patológicas con un comportamiento biológico definido por la morfología celular y las características tisulares (Valli y Ramos – Vara, 2010), sin embargo, el diagnóstico de esta neoplasia es complementada con análisis inmunofenotípicos y características genéticas por su complejidad (Guija de Arespacochaga *et al.*, 2007). Es de importante consideración que los métodos inmunohistoquímicos no se encuentran disponibles en los centros de diagnóstico de nuestro país, por lo que se hace necesaria la aplicación de los criterios histopatológicos basados en un sistema estandarizado de clasificación, con la finalidad de establecer un diagnóstico más preciso del tipo histológico, aplicar un tratamiento específico y estimar un pronóstico adecuado.

Se han descrito múltiples ventajas del diagnóstico histopatológico con respecto al citológico, ya que características tisulares como patrón, invasión de tejidos adyacentes e infiltración neoplásica a nivel capsular son evaluadas en la histopatología (Valli, 2007); además para los casos de linfomas indolentes, tal como el linfoma de células del Manto, linfoma de la zona T y linfoma de la Zona Marginal, la citología sólo revela una población uniforme de linfocitos pequeños, de tal manera que no se observa características como patrón y distribución del tejido linfoide atípico, siendo considerados como procesos benignos (Valli, 2007). Con respecto a la diferenciación del tipo T y B, Vezalli *et al.* (2009) indica que, como regla general, histológicamente los linfomas de células B poseen un menor pleomorfismo que los linfomas de células T (a excepción del linfoma linfoblástico T), además de estar asociados con neoangiogénesis e inflamación (Vezalli *et al.*, 2009). En cuanto al pronóstico de sobrevida, los últimos estudios de importancia histopatológica determinaron que perros que padecían linfomas con un índice mitótico mayor a 20 mitosis/400x tuvieron un tiempo

de sobrevivencia de 33 días, mientras que, los que presentaron un índice mitótico menor a 20 mitosis/400x, un tiempo de sobrevivencia de 188 días (Valli, 2013). En nuestro medio, esta enfermedad se suele diagnosticar sólo como “linfoma” basado en el diagnóstico citológico y en lo que respecta a los tratamientos, por sus características biológicas sistémicas, además de la sensibilidad celular (Guinel-Perez, 2008) la quimioterapia ha sido la terapéutica más utilizada para este tipo de neoplasia (Valli *et al.*, 2011), estos esquemas, por lo general, se basan en la aplicación de agentes paliativos como la doxorrubicina, L-asparaginasa, vincristina, ciclofosfamida, clorambustilo y prednisona (Ettinger, 2003; Marconato, 2011). Sin embargo, últimos estudios realizados por Valli (2013) demostraron que el linfoma se trata de una enfermedad heterogénea con diversas respuestas a los tratamientos empleados y que, de acuerdo a determinadas características histológicas como la morfología e índice mitótico (Coyle y Steinberg, 2004; Valli, 2006), se predice el tiempo de supervivencia de un determinado tipo y la respuesta al tratamiento empleado. Es necesaria la selección de protocolos específicos de los tipos individuales de linfoma con el objetivo terapéutico más cercano al tratamiento curativo, y la adaptación probable de tratamientos de uso en medicina humana, debido a que estudios genéticos en mamíferos indican que los mismos tipos de linfoma en humano y en el canino responden a un similar tipo de terapia (Moore *et al.*, 1995; Patginis *et al.*, 1997).

Las clasificaciones de los linfomas han sido diversas y han ido evolucionando en los últimos años. La mayoría de los esquemas han sido adaptadas desde el linfoma humano (Parodi, 2001). La Organización Mundial de la Salud separa los linfomas desde su origen celular como célula precursora o célula madura y define cada tipo según características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas obteniendo como ventaja la caracterización de los linfomas extraganglionares, distinguiendo cada entidad histopatológica según la diferenciación, tamaño celular y la agresividad en relación con el pronóstico, este sistema de clasificación se diferencia de otras clasificaciones como la de Kiel y Working Formulation que consideran únicamente los criterios morfológicos, como el crecimiento dentro del linfonódulo (nodular o difuso), y el tamaño de las células neoplásicas (pequeñas, grandes o mixtas). Además, Valli y Ramos Vara (2010) demostraron que la aplicación de la clasificación histológica de la OMS es un sistema práctico para patólogos veterinarios no especialistas en Hematopatología mediante una capacitación previa. Valli (2013), basado en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, reportó la frecuencia de los principales tipos de linfoma de un total de 992 pacientes en: Linfoma difuso de células B grandes (39.3%) (subtipo inmunoblástico (9.1%), subtipo centroblástico (38.4%), rico en células T (0.9 %)), linfoma de la zona marginal (6.5%), linfoma periférico de células T inespecífico (13.6%), linfoma de la zona T (11.2 %), linfoma linfoblástico (4.8%), linfoma de células del Manto (1.6%) y linfoma folicular (0.3%),

determinando 7 linfomas, en tanto que en el presente estudio se logró clasificar 6 tipos histológicos de 12 tipos de linfomas estandarizados.

Entre el año 1996 al 2012, se hallaron en el LHEPV-FMV-UNMSM sólo 16 láminas diagnosticadas de un total de 179 casos diagnosticados con linfoma, lo que revela que el diagnóstico del linfoma canino se basa únicamente en la actualidad en el diagnóstico citológico, optándose por el tratamiento clásico sin evidencia del tipo celular comprometido. Los datos hallados no son estadísticamente significativos debido a la escasa cantidad de muestras que se obtuvieron, por lo que es necesario que se convaliden con estudios con un mayor tamaño muestral, evitándose el sesgo. Este bajo número muestral de nuestro estudio es posible que sea explicado por varios factores involucrados, entre estos, la falta práctica por parte de los médicos clínicos al solicitar una biopsia, así como no indagar sobre la causa de muerte en estado avanzado de otras formas de linfoma.

El uso de la inmunohistoquímica es preciso para confirmar el linaje celular de células T y B para varios tipos de linfoma (Valli 2006), sin embargo, al tratarse de ser un estudio retrospectivo y no contar con los paneles de marcadores inmunohistoquímicos, se sugirió distintos tipos de linfoma sólo con la aplicación de los criterios histológicos de la Organización Mundial de la Salud dentro de los límites que nos permite la histopatología.

En el presente estudio, se determinó que el linfoma de células B grande difuso es el tipo de mayor presentación (43.75%) (7/16), frecuencia similar a la descrita por Valli (2009), en la cual concluye que el linfoma de células B grande difuso se presenta en 57.7% (56/97). En el 2010, Valli y Ramos – Vara determinaron mediante un estudio de evaluación a patólogos veterinarios no expertos en hematopatología, que el linfoma de células B grande difuso se presenta en 50.80 % (145/285) del total de los casos recolectados por el Colegio Americano de Patólogos Veterinarios en veinte estados norteamericanos. Estudios últimos de Valli *et al.*, (2013) determinaron mediante un estudio retrospectivo una frecuencia del subtipo centroblástico 38.4% (381/992) y subtipo inmunoblástico 9.1% (90/992), datos que no concuerdan con los obtenidos en este estudio, donde el subtipo inmunoblastico obtuvo 25.00% (4/16) y subtipo centroblástico 12.50% (2/16) debido al tamaño muestral bajo en el presente trabajo. Estos subtipos fueron divididos en dos categorías diferentes de acuerdo a sus tasas mitóticas por Valli *et al.* (2013) y se concluyó que los animales que fueron tratados con quimioterapia con o sin hydroxydaunorubicina mostraron un mayor tiempo de supervivencia con respecto a aquellos que solo fueron tratados con prednisona y con aquellos que no recibieron tratamiento alguno. El subtipo rico en células de T del linfoma de células B grande difuso se determinó en una

frecuencia de 6.25% (1/16), no obstante, Valli (2007) indica que es un subtipo raro en perros pero es más frecuente en gatos y caballos y en el 2013, reportó 0.9% (9/992)

Respecto al linfoma de células del Manto, se obtuvo una frecuencia de 18.75% (3/16) (Fig. 12 y 13) a nivel esplénico, hallazgos coincidentes con los de Valli (2006), quien reportó todos los casos obtenidos de linfoma de células del manto sólo en bazo. El linfoma de células del manto es uno de los linfomas malignos en humanos de mayor agresividad con un tiempo de sobrevivencia menor de 3 – 5 años, representando 3 – 10% de los linfomas no Hodgking (Valli, 2006), sin embargo, en caninos la frecuencia es desconocida (Guinel-Perez, 2008). A nivel de sus características celulares, el linfoma de células del manto parece similar al de los humanos, aunque la diferencia radica en que los caninos desarrollan este tipo de linfoma más en bazo que en linfonódulos (Valli, 2006). Uno de los casos obtenidos en el presente estudio como linfoma de células del manto en el año 2012 fue evaluado en base a sus hallazgos macroscópicos. Se determinó que la tumoración que se desarrolló en bazo era de características ovalada, rojiza oscura y de distribución focal, datos que coinciden con los de Valli (2006) quién menciona que en caninos, este tipo de linfoma es más frecuente en bazo y que la lesión es focal a diferencia del humano, en el que se presenta de manera difusa a nivel esplénico y que además se presenta como una enfermedad diseminada que afecta linfonódulos, medula ósea y tracto gastrointestinal. Los hallazgos de necropsia revelaron que el bazo que presentaba una tumoración de forma ovalada, caracterizada por tener una superficie irregular, debridada, de 5 cm de diámetro aproximadamente, encapsulado pero con zonas de solución de continuidad, consistencia deleznable, de coloración rojiza oscura y situada a nivel del polo caudal esplénico, el resto del parénquima presentaba superficie irregular y al corte protrusión de estructuras blanquecinas. Estas características son similares a las descritas previamente por Valli (2007) y Guinel – Perez (2008), quienes reportan que este tipo de linfoma presenta una distribución focal o multifocal, delimitado, de consistencia maciza a nivel esplénico. La historia del animal no reporta signos asociadas a la neoplasia sino hasta que se produce la distensión de la cápsula esplénica por el crecimiento tumoral, casos confirmados por linfoma de células del manto han revelado dolor a la palpación abdominal (Guinel-Perez, 2008), signo indicado en la historia del animal. Los linfomas nodulares se asocian con periodos largos de supervivencia incluso sin efectuar algún tratamiento, en caso de pacientes humanos con frecuencia se opta por no tratar hasta que el tumor genere signos, debido a que un tratamiento rápido no parecía mejorar el resultado final. Últimamente se ha cuestionado esta práctica y se recomienda iniciar el tratamiento rápidamente (Valli, 2007). Debido a que es un tumor de crecimiento lento, su sensibilidad a los fármacos antimitóticos empleados en la quimioterapia es baja (Valli, 2006). Por este motivo, siempre que no se constate de colonización de estructuras perilinfáticas o

periesplénicas que ocurre en las fases finales de su evolución (Jacobs *et al.*, 2002), es aconsejable realizar la esplenectomía (Guinel-Perez, 2008). Esta opción se considera la más recomendable en humanos con linfomas esplénicos de células del manto, y mayor aún si existen citopenias. En conclusión, según los resultados de este caso clínico, la esplenectomía puede ser curativa en este tipo de linfomas foliculares, siempre que sean diagnosticados antes de su diseminación (Guinel-Perez, 2008). En nuestro caso no fue necesario realizar estudio inmunohistoquímico al ser los linfomas del manto exclusivos de células B. Aunque existe una información muy limitada en el perro, los linfomas indolentes de células T también siguen un curso lento y son poco agresivos localmente (Valli, 2006).

El linfoma linfoblástico se determinó en una frecuencia de 12.50% (2/16) (Fig. 12 y 13) en un linfonódulo no especificado y en hígado. Ponce *et al.* (2012) reportó una frecuencia de 2.82% y Valli (2011) una frecuencia de 4% (12/300). Se presentan dos tipos, linfoma linfoblástico T y linfoma linfoblástico B, sin inmunohistoquímica es indistinguible diferenciar el tipo T y el B; la literatura reporta una mayor frecuencia del tipo T, sin embargo, Valli (2013) demostró que ambos tipos de linfomas tienen un alto índice de mitosis y poseen una respuesta similar clínicamente a la quimioterapia, siendo difícil obtener una remisión de los linfonódulos por un tiempo prolongado, características que generan que sean agrupados en una categoría clínica por igual. Este tipo de linfoma frecuentemente involucra a linfonódulos, además de presentar una diseminación rápida a órganos viscerales (Valli *et al.*, 2011). Este tipo de linfoma está asociado a perros con rápida aparición de signos de reducción del apetito y actividad física, además de reportarse como el linfoma más agresivo en la práctica veterinaria (Vezalli, 2009).

El linfoma periférico de células T inespecífico fue determinado en un 12.50% (2/16) en piel y mucosa labial (Fig. 14). Valli (2011) reportó una frecuencia de 15% (42/280) y en el año 2013 reportó una frecuencia de 13.6% (135/992), además de ubicarlo en hígado, intestino y linfonódulos. Este tipo de linfoma incluye todos los linfomas de células T que no son categorizados y cuya localización es extratímica. En cuanto a características clínicas, Valli (2013) reporta que no hubo diferencias entre animales tratados con quimioterapia con y sin hydroxydaunorubicina de animales que solo recibieron prednisona y de animales que no tuvieron tratamiento alguno, concluyendo que se trata de un linfoma resistente al tratamiento quimioterapéutico.

El linfoma anaplásico de células grandes se determinó en el presente estudio en un 6.25% (1/16) (Fig. 16), en tanto Valli *et al.* (2013) menciona una frecuencia de 1% (10/992) además de reportar un caso de este tipo de linfoma en el año 2006, un perro de raza grande de un año de edad, el cual presentaba lesiones a nivel cutáneo de forma generalizada y adenopatías

periféricas. Un caso fue evaluado en cuanto a sus hallazgos macroscópicos, los cuales revelaron un incremento del linfonódulo submandibular en dimensiones aproximadamente de 12 cm de ancho x 5 cm de largo, una lesión cutánea abscesada que no fue remitida para su estudio histopatológico y a nivel de la cavidad abdominal, se evidenció esplenomegalia y hepatomegalia. Se realizó el examen histopatológico del linfonódulo, bazo e hígado, la imagen histológica reveló una proliferación linfoide de células linfocíticas atípicas con citoplasma vacuolado, núcleos reniformes, elongados, tamaño celular mayor de 2 veces en relación al diámetro de un glóbulo rojo, presencia de células binucleadas y un índice mitótico de 3 mit/400x a nivel del linfonódulo submandibular; células con las características anteriormente descritas fueron halladas infiltrando a nivel del parénquima de hígado y bazo. Por las características celulares, este caso corresponde al linfoma anaplásico de células grandes, la cual se caracteriza por la presencia de células denominadas “hallmarks cells” (Valli, 2007) (Fig. 16), estas células presentan una morfología nuclear reniforme, prominentes y muchas binucleadas. Valli (2007) menciona dos tipos de presentación de este tipo reconocidas, la primaria cutánea y la primaria sistémica. La forma cutánea es una neoplasia que rara vez ha sido identificado en perros (Valli, 2007), arquitectónicamente cuenta con áreas solidas de gran proliferación de células de núcleos alargados, reniformes y voluminosas (Valli, 2007). La forma sistémica se presenta comúnmente con un fenotipo T, este tipo se presenta mayormente a nivel nodal y puede afectar la mayoría de tejidos (Valli, 2007). Este es uno de los primeros reportes que se presentan en Sudamérica de este tipo Se sugiere realizar una investigación a futuro con la finalidad de estimar la ocurrencia de presentación en los caninos de Lima.

El linfoma de células T - Mycosis fungoides se determinó en un 6.25% (1/16) (Fig. 17, 18 y 19), mientras que Ponce *et al.* (2012) reporta un 59% (25/42) de los linfomas cutáneos tipo micosis fungoides en caninos, frecuencia similar a la determinada en humanos (50%) por Cerroni *et al* (2004), además de tener similitudes a los descritos a los de humanos (Jaffe *et al.*, 2001). Son limitados los estudios que correlacionan raza y edad con respecto a tipo. Es así que Fournel – Fleury *et al* (2012) reportan una correlación entre linfoma linfoblástico T en animales jóvenes y linfomas cutáneos en animales adultos. En cuanto a raza, Ponce *et al.* (2012) determinaron que la raza bóxer presenta la mayoría se tipos de linfoma canino. En nuestro estudio halló un caso de linfoma linfoblástico en una hembra de 6 años (adulto) e igual número de casos de tipos de linfoma canino en la raza bóxer, Schnauzer y cruzados. Finalmente, el uso de los criterios histológicos de la OMS permite la clasificación de los diversos tipos de linfomas caninos, sin embargo, es necesaria la realización de más estudios que correlacionen tipo, tratamiento y pronóstico; siendo estos criterios de clasificación una herramienta de utilidad para oncólogos y patólogos veterinarios.

VI. CONCLUSIONES

- La histopatología utilizando los criterios de la Organización Mundial de la Salud sugiere la clasificación de los tipos de linfoma canino.
- Mediante la clasificación histopatológica los tipos linfoma de células B grande difuso (subtipos inmunoblástico, centroblástico y rico en células T), linfoma de células del Manto, linfoma linfoblástico, linfoma T anaplásico de células grandes, linfoma periférico de células T inespecífico y, linfoma de células T –Micosis fungoides fueron sugeridos.
- El linfoma de células B grande difuso fue el tipo más frecuente 7/16 (43.75%), siendo el subtipo inmunoblástico, el de mayor presentación 4/16 (25.0%).

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda estandarizar los criterios histopatológicos de la OMS en linfomas caninos para la clasificación precisa de los tipos, para obtener un pronóstico y tratamiento específico.

6. Blackwood L, German A, Stell A. 2004. Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy, *J Small Anim Pract* 45: 259-262.
7. Blair A. 1990. Herbicides and non Hodgkin lymphoma: new evidence from a study of Saskatchewan farmers, *I. Natl Cncer Inst* 82:544-545.
8. Blood. 1997. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Jun* 1;89(11):3909-18
9. Bunn PA, Minna JD. 1995. Paraneoplastic syndromes. En: Devit AV,eds. *Câncer – Principales and Practicy of Oncology*. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott. p 1797.
10. Bunt A, Hermans J, Smit V. 1995. Surgical/pathologic-stage migration confounds comparison of gastric cancer survival rates between Japan and Western countries, *J Clin Oncol* 13:19-25.
11. Burnett R, Vernau W, Modiano J, Oliver C, Moore P, Avery A. 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.* 40, 32–41.
12. Bush W, Throop J, McManues P. 2003. Intravascular lymphoma involving the central and peripheral nervous systems in a dog, *J Am Anim Hosp Assoc* 39:90-96.
13. Carlo GL, Cole P, Miller A. 1992. Review of a study reporting an association between 2,4 – dichlorophenoxyatic acid and canine malignant lymphoma: report of an expert panel, *Regul Toxicol Pharmacol* 16:245-252.
14. Carter R, Valli V, Lumsden J. 1986. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formmulation, *Caan J Vet Res* 50: 154-164.
15. Chapman A, Bopp W, Brightwell A. 1967. A preliminary report on virus-like particles in canine leukemia and derived cell cultures, *Cancer Res* 27:18-25.

16. Couto C, Gullen J, Pedroia U, Turrel J. Central Nervous System lymphosarcoma in the dog. J Am Vet Med Ass, 1984: 184:809-813.
17. Couto C, Hammer A. 1995. Disease of the lymph Nodes and the Spleen. Textbook of Veterinary Internal Medicine. USA: Saunders Company.
18. Couto, CG. Canine Lymphomas. 1985. Something New, Something Old. Compend Contin. Educ. Pract Vet v.7: 291 – 302.
19. Couto, C. Linfoma no cão e no gato. En: Nelson R, Couto C. 2001. Medicina Interna de Pequenos Animais. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara p 882 – 889.
20. Cowell R., Tyler R. 2009. Diagnóstico citológico y hematológico del perro y gato. 3ª edición. España: Elsevier Mosby
21. Crow SE. 1997. Biologia dos tumores. En: Crow. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3ª ed. São Paulo: Manole p. 539 – 552.
22. Day M. 1995. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat, J Comp Pathol 112:79-96.
23. Dhaliwal R, Kitchell B. 2003. Canine lymphosarcoma: clinical features. Compendium 25: 572-580.
24. Dobson J, Blackwood L, McInnes E. 2001. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. J Small Anim Pract 42:377-384
25. Donald McGavin; Zachary J. 2007. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ta Ed. USA: Mosby
26. Duncan, J.R. 1993. The lymph nodes. En: Cowell y Tyler, eds. Diagnostic cytology of the dog and cat. 3ª ed. USA: Elsevier p. 93 -98.
27. Figuera R, Souza T, Barros C. 2002. Linfossarcoma em cães. Ciência Rural Vol. 32, n. 5. p. 895 – 899.

28. Fisher D, Naydan D, Werner L. 1997. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples, *Vet Clin Pathol* 26:66-69.
29. Fournel – Fleury C, Magnol J, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non Hodgkins lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117: 35-59.
30. Fournel-Fleury C, Magnol J, Bricaire P. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non Hodgkin lymphomas, *J Comp Pathol* 117:35-59.
31. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P. 2002. Canine T cell lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases, *Vet Pathol* 39:92-109.
32. Frizzera G, Wu D, Inghirami G. 1999. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol* 111 (Suppl. 1): S13-S39.
33. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R. 2001. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners, *J Vet Intern Med* 15: 190-195.
34. Gear R. 2009. Practical update on canine lymphoma. Classification and diagnosis. *In Practice* 31: 380-384.
35. Gentilina F, Calzolari C, Turbaa M. 2005. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP)2 and 9 in lymphoma-affected dogs, *Leuk Res* 29: 1263-1269.
36. Gerger B, Hauser B, Reusch C. 2004. Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcemia, *Vet Res Commun* 28: 669-680.

37. Greenlee P, Filippa D, Quimby F. 1990. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study, *Cancer* 66: 480-490.
38. Grindem C, Breitschwadt E, Corbett W. 1994. Thrombocytopenia associated with neoplasia in dogs, *J Vet Intern Med* 8:400-405.
39. Guija de Arespacochaga A, Schwendenwein I, Weissenboeck H. 2007. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 136, 186-192.
40. Harris N, Jaffe E, Stein H. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-1392.
41. Harris NL. Diagnosis and classification of lymphomas. En: Colvin RB, BhanAK, McKluskey RT. 1995. *Diagnostic Immunopathology*. New York: Raven Press, 501-534
42. Harris NL, Jaffe, ES. 1997. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia. *Histopathology* 36, 69–89
43. Hahn K, Freeman K, Barnhill M. 1999. Serum alpha 1 – acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treatments with doxorubicin, *J Am Vet Med Assoc* 214:1023-1025
44. Jain W. 1986. The Leukemia complex. In Schalm's veterinary hematology, ed 4, Philadelphia: Lea & Febiger.
45. Jemal A, Tiwari R, Murray T. 2004. Cancer statistic: 2004, *CA Cancer J Clin* 54:8-29.
46. Kaeene J, Miller R. 1999. Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma, *Vet Hum Toxicol* 41: 164-170

47. Kaiser H, Animal neoplasms. 1981. A systemic review. En Kaiser He. eds. Neoplasms: comparative pathology in animals, plants and man. Baltimore: William & Wilkins.
48. Keller E, MacEwen E, Rosenthal R. 1993. Evaluation of prognosis factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma, J Vet Intern Med 7:289-295.
49. Keller S, Keller B, Grest P, Börger T, Güscetti F. 2007. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine mylphomas. Vet. Diagn. Invest. 19:652-659.
50. Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. 1998. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. Epidemiol Rev 20: 204-217.
51. Kiupel M, Bostock D, Bergmann V. 1998. The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas, J Comp Pathol 119:407-418.
52. Kiupel M, Teske E, Bostock D. 1999. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. Vet Pathol; 36: 292-300.
53. Krohne S, Vestre W, Richardson R. 1987. Ocular involvement in canine lymphosarcoma: a retrospective study of 94 cases, Am College Vet Ophth, Proc. 68-84.
54. Kruiningen, HJ. Sistema gastrointestinal. 1998. En: Carlton W, McGavin MD, Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2 ed. Porto Alegre: ArteMed, p. 13 – 94.
55. Larue S, Fo M, Ogilvie G. 1999. Tumor cell kinetics as predictors of response in canine lymphoma treated with chemotherapy alone or combined with whole body hyperthermia. Int J Hyperthermia 15: 475-486.

56. Laurent A. Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals. 2001. History and Conceptual Evolution. European Journal of Veterinary Pathology. Vol. 7 No. 2.
57. Leib M, Bradley R. 1987. Alimentary lymphosarcoma in a dog. Comp Pract Vet Cont Ed 9:809-815.
58. Lennert K, Feller A. 1990. Histopathology of non Hodking lymphoma (based on the update Kiel classification), 2^a ed. Berlín: Springer-Verlag.
59. Levine A. 1994. Lymphoma complicating immuno deficiency disorders. Ann Oncol 5:29-36.
60. Lieberman P, Filippa D, Straus D. 1986. Evaluation of malignant lymphomas using three classifications and the working formulation; 482 cases with median follow-up of 11. Years, Am J Med 81:365-380.
61. Lindblad – Toh K, Wade C, Mikkelsen T. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structura of the domestic dog, Nature 438:803-819.
62. Mayr B, Holzheu M, Schaffner G. 2003. N-ras mutation in a canine lymphoma: short communiacion. Acta Vet Hung 51:91-94.
63. MacEwenE, Brown N, Patnaik A. 1981. Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma, J Am Vet Med Assoc 178:1178-1181.
64. MacEwen E, Patnaik A, Wilkins R: Diaagnosis and treatment of canine hematopoietic neoplasms, Vet Clin North AAm Smaall Anim Pract 7:105-118, 1977
65. Maclachlan NJ, Cullen J. Fígado, Sistema biliar e pâncreas exócrino. En: Carlton W, McGavin M. D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2ed. Porto Alegre: Artemed, 1998. p. 95 – 131.
66. Madewell B. 1986. Hematological an d bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma, J Am Anim Hosp Assoc 22:235-240.

67. Madewell B, Theillen G. 1987. Hematopoietic neoplasms, sarcoma and related conditions. En: Febinger L. Veterinary Cancer Medicine. 2^a ed. Philadelphia p. 392 – 407.
68. Massa K, Gilger B, Miller T. 2002. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). Vet Ophthalmol 5:9-98.
69. Meuten JD. 2002. Tumors in domestic animals. 4^a ed. USA: Iowa State Press
70. Modiano J, Breen M, Burnett R. 2005. Distinct B cell and T cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk, Cancer Res 65:5654-5661.
71. Moore P, Olivry T, Naydan D. 1994. Canine cutaneous epitheliotrophic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD+8 T cells, Am J Pathol 144: 421-429.
72. Moore A, Leveille C, Reimann K. 1995. The expression of P – glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance, Cancer Invest 13:475-47.
73. Moreno-Ramirez A, Herrera A. 2003. Diagnóstico y tratamiento de los linfomas cutáneos primarios de células T. Med Cutan Iber Lat Am 31(2): 75-100
74. Morris J; Dobson J. 2001. Small Animal Oncology. 5^a ed. Usa: Blackwell science
75. Moulton JE, Harvey JW. 1978. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues in Tumor in domestic animals. 1^a ed. USA: California
76. Moulton J, Harvey J: Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue. In Moulton J, editor: Tumors of domestic animals. Ed. 3, Berkeley, Calif 1990. University of California Press
77. National Cancer Institute. 1982. Sponsored study of classification of non Hodgking lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage.

The Non Hodking Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49:2112-2135.

78. Nasir L, Devlin P, McKevitt T. 2001. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues, Neoplasia 3:351-359.
79. Nathwani B, Brynes R, Lincoln T. 1992. Classifications of non Hodking lymphomas. In Knowles D, ed: Neoplastic hematopathology, Baltimore: Williams & Wilkins.
80. Nyland T, Park R. 1983. Hepatic ultrasonography in the dog. Vet Radiol 24:74-84.
81. Oberling, C. 1928. Les reticulosarcomes et les reticulo-endotheliosarcomes de la moelle osseuse (sarcome d'Ewing). Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 17 : 259-296.
82. Ogilvie GK, Moore A. 1995. A practice manual: Managing the Veterinary Cancer Patient. 1^a ed. New Jersey: triton. p. 542.
83. Ogilvie G, Moore A. 1995. Tumors of Canine Spine, Managing the Veterinary Cancer patient. Veterinary Learning Systems Company. INC: 299-300.
84. Onions D. 1984. A retrospective survey of familial canine lymphosarcoma, J Natl Cancer Inst 72:09-912.
85. Oltersdorf T, Elmore S, Shoemaker A. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, Nature 435:677-681.
86. Padilla M. 2009. Clasificacion de los linfomas. pasado, presente y futuro. Rev Inst Med Su: LXXV(134)
87. Pappo A; Shapiro D; Crist W. 1997. Rhabdomyosarcoma: biology and treatment. Pediatric Clinics of Norton America; 44(4): 953-972
88. Parodi A, Wyers M, Paris J. 1968. Incidence of canine lymphoid leucosis: age, breed and sex distribution- results of necropsy survey, Bibl Haematol 30: 263.267.

89. Penn I. 1990. Cancers complicating organ transplantation. N engl JMed 323: 1767 – 1771.
90. Phillips B, Kass P, Naydan D. 2000. Apoptic and proliferation indexes in canine lymphoma, J Vet Diagn Invest 12:111-117.
91. Ponce F, Magnol J-P, Ledieu D. 2004. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy, Vet J 167:158-166.
92. Priester W, McKay F. 1980. The occurrence of tumors in domestic animals, National Cancer Institute Monogr 54:1-210.
93. Rappaport H. 1996. Tumors of the hematopoietic system. In Atlas of tumor pathology, Washington D. Armed Forces Institute of Pathology
94. Raurell X, Laporta, D. Linfoma epidural. 1998. Un caso clínico. Clinica Veterinaria de Pequeños animales (Avepa) Vol. 18 n°2.
95. Rappaport, H. 1966. Tumors of the hematopoietic system. Atlas of tumor pathology, Sect.3, Fasc.8. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
96. Reif J, Lower K, Ogilvie G. 1995. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma, Am J epidemiol 141: 352-359.
97. Ridge L, Swinney G. 2004. Angiotrophic intravascular lymphosarcoma present – ing as hemothorax effusion in a dog, Aust Vet J 82: 616-618.
98. Robb-Smith. 1938. Reticulosis and reticulosarcoma. A histological classification. J. Pathol. Bacteriol., 47 : 457-480
99. Robbins, Cotran, Kumar y Collins. 1999. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Pennsylvania. USA: Saunders Elsevier
100. Romani A, Sant' ana FJ. 2005. Linfossarcoma multicêntrico em um cão relato de caso. Ciência Animal Brasileira. Goiânia. V.5. p. 223 – 225.

101. Rosciani, A, Koscinczuk, P. Diagnóstico citológico por punción con aguja fina de Linfoma No Hodgkin de tipo alimentario en un canino. Sesión de Comunicaciones Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNNE. 1994
102. Rosin A. 1982. Neurologic diseases associated with lymphosarcoma in ten dogs, J Am Vet Med Assoc 181: 50-53.
103. Roulet F. 1930. Das primäre Retothelsarkom der Lymphoknoten. Virchows Arch. Path. Anat. 277:15-47.
104. Ruslander D, Gebhard D, Tompkins M. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders, In Vivo 11:169-172.
105. Shadduck J, Reedy L, Lawton G. 1978. A canine cutaneous lymphoproliferative disease resembling mycosis fungoides in man. Vet Pathol 15:16-724.
106. Searcy, GP. Sistem hemopoético. En: Carlton W, McGavin M. 1998. Patología Veterinaria Especial de Thomson. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed. p. 305 – 352.
107. Skudder P, Schwartz S. 1985. Primary lymphoma of the gastrointestinal tract, Surg Gynecol Obstet 160:5-8.
108. Socorrás. 2002. Linfomas B y T. Diagnóstico inmunofenotípico de los linfomas no hodgkinianos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2002;19(1)
109. Sueiro R, Carlos A, Aparecido C, Aparecida P, Vassallo J. 2005. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. J Bras Patol Med Lab 41: 263-270.
110. Shih-Hung H, Philip J, Kozak J. 2012. Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. Virology, 2012; DOI:10.1016/j.virol.2012.02.013
111. Starrak G, Berry C, Page R. 1997. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. Vet Radiol Ultrasound 38:411-418.

112. Strandstrom H, Rimaila-Parnanen E. 1979. Canine atypical malignant lymphoma. *Am J Vet Res* 40:1033-1034.
113. Swerdlow S, Campo E, Harris N. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4th). Lyon, France: IARC Press.
114. Teske E, Egberink H. 1994. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q* 16:134-136.
115. Teske E, Egberink K. 1993. Clustering of canine lymphoma in Non-Hodgkin lymphoma in the dog: characterization and experimental therapy. Tesis de Médico Veterinario. Universidad de Utrecht. 48 p.
116. Teske E, Van Heerde P, Rutteman G. 1994. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 205:1722-1728.
117. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. 1997. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group. Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, Vol 89, No 11. p 3909-3918.
118. Thomas R, Smith K, Bould R. 2001. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers, *Chromosome Res* 9:649-657.
119. Tomley F, Armstrong S, Mahy B. 1983. Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants. *Br J Cancer* 47:277-284.
120. Trigo, FJ. 1998. Patología Sistémica Veterinaria. 3ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
121. Vail D, Ogilvie G. 2003. Neoplasias Linfóides. En: Birchard, SJ.; Sherding, R. G. *Manual Saunders Clínica de Pequeños Animais*. 2 ed. São Paulo: Roca. p. 227 – 236.
122. Vail D, Young K. 2009. En: Withrow S. *Oncología Clínica de pequeños animales*. 4ed. España: Saunders Elsevier. p 685-711.

123. Van J.E, Gruys E.,Mouwens J.M., 2007. Color Atlas Veterinary Pathology. 2a edition. USA: Saunders Elsevier
124. Vail D, Kisseberth W, Obradovich J. 1996. Assessment of potential doubling time, argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNor), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non Hodgkin lymphoma, *Exp Hematol* 24:807-815.
125. Valli, W. Vernau, L.-P. de Lorimier, P. S. Graham and P. F. Moore. Canine Indolent Nodular Lymphoma. 2006. *Vet Pathol* 43: 241. DOI: 10.1354/vp.43-3-241
126. Valli V, Caswell J, Jacobs R, Parodi A. 2002. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals, EWashington. Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization.
127. Valli V,Vernau W, De Lorimier L, Graham P, Moore P. 2006. Canine Indolent Nodular Lymphoma. *Vet Pathol* 2006 43: 241
128. Valli V. 2007. Veterinary comparative hematopathology. 5^a ed. USA: Blackwell Publishing.
129. Valli V, Caswell J, Ramos-Vara J. 2010. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol* 48: 198.
130. Valli V, Kass P, San Myint M, Scott F. 2013. Canine Lymphomas : Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol* 00(0)
131. Vela Casas F. Linfomas no-Hodgkin y enfermedad de Hodgkin *Pediatr Integral* 2004;VIII(6):475-486
132. Veldhoen N, Stewart J, Brown R. 1998. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53. *Oncogene*. Jan 15;16(2):249-55.

133. Vezzali E, Parodi A, Marcato P. 2009. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8, 1, 38–49.
134. Von Euler H, Einarsson R, Olsson U. 2004. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease, *J Vet Intern Med* 18:595-56.
135. Weir E, Norrdin R, Matus R. 1988. Humoral hypercalcemia of malignancy in canine lymphosarcoma, *Endocrinology* 122: 602-608.
136. Weir E, Greele P, Matus R. 1988. Hypercalcemia in canine lymphosarcoma is associated with the T cell subtype and with secretion of a PTH-like factor *J bone Miner Res* 3:S106.
137. Weisenburger D. 1994. Epidemiology of non-Hodgkin lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic, *Ann Oncol* 5:519.
138. Weller R, Hoolmberg C, Theilen G. 1980. Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma, *Am J Vet Res* 41: 1310-1314.
139. Weller R. 1985. Paraneoplastic disorders in the dog with hematopoietic tumors, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15:805-816.
140. Weller R, Hoffman W. 1992. Renal function in dogs with lymphosarcoma and associated hypercalcemia, *J Small Anim Pract* 33:61-66.
141. Wellman, ML. Neoplasia hematopoética e linfóide. 1996. En: Bojrab, M.J. *Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais*. 2ª ed. São Paulo: Manole. p.737 – 749
142. Whang-Peng J, Knutsen T, Jaffe E. 1995. Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin lymphoma: clinical correlations with cytogenetics, histologic, immunophenotyping and molecular studies. *Blood* 85: 203 – 216.

143. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 179-196.
144. Winkler S, Murua EH, Reimann-Berg N, Bullerdiek J, Nolte I. 2005. Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. *Antican Res* 25:3995-3998.
145. Yazawa M, Okuda M, Kanaya N. 2003. Molecular cloning of the canine telomerase reverse transcriptase gene and its expression in neoplastic and nonneoplastic cells, *Am J Vet Res* 64: 1395-1400.
146. Yunis J, Oken M, theologides A. 1984. Recurrent chromosomal defects found in most patients with non Hodking lymphoma, *Cancer genet Cytogenet* 13, 17-28.

6. Blackwood L, German A, Stell A. 2004. Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy, *J Small Anim Pract* 45: 259-262.
7. Blair A. 1990. Herbicides and non Hodgkin lymphoma: new evidence from a study of Saskatchewan farmers, *I. Natl Cncer Inst* 82:544-545.
8. Blood. 1997. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Jun 1;89(11):3909-18*
9. Bunn PA, Minna JD. 1995. Paraneoplastic syndromes. En: Devit AV,eds. *Câncer – Principales and Practicy of Oncology*. 2^a ed. Philadelphia: Lippincott. p 1797.
10. Bunt A, Hermans J, Smit V. 1995. Surgical/pathologic-stage migration confounds comparison of gastric cancer survival rates between Japan and Western countries, *J Clin Oncol* 13:19-25.
11. Burnett R, Vernau W, Modiano J, Oliver C, Moore P, Avery A. 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Vet. Pathol.* 40, 32–41.
12. Bush W, Throop J, McManues P. 2003. Intravascular lymphoma involving the central and peripheral nervous systems in a dog, *J Am Anim Hosp Assoc* 39:90-96.
13. Carlo GL, Cole P, Miller A. 1992. Review of a study reporting an association between 2,4 – dichlorophenoxyatic acid and canine malignant lymphoma: report of an expert panel, *Regul Toxicol Pharmacol* 16:245-252.
14. Carter R, Valli V, Lumsden J. 1986. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formmulation, *Caan J Vet Res* 50: 154-164.
15. Chapman A, Bopp W, Brightwell A. 1967. A preliminary report on virus-like particles in canine leukemia and derived cell cultures, *Cancer Res* 27:18-25.

16. Couto C, Gullen J, Pedroia U, Turrel J. Central Nervous System lymphosarcoma in the dog. J Am Vet Med Ass, 1984: 184:809-813.
17. Couto C, Hammer A. 1995. Disease of the lymph Nodes and the Spleen. Textbook of Veterinary Internal Medicine. USA: Saunders Company.
18. Couto, CG. Canine Lymphomas. 1985. Something New, Something Old. Compend Contin. Educ. Pract Vet v.7: 291 – 302.
19. Couto, C. Linfoma no cão e no gato. En: Nelson R, Couto C. 2001. Medicina Interna de Pequenos Animais. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara p 882 – 889.
20. Cowell R., Tyler R. 2009. Diagnóstico citológico y hematológico del perro y gato. 3ª edición. España: Elsevier Mosby
21. Crow SE. 1997. Biologia dos tumores. En: Crow. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3ª ed. São Paulo: Manole p. 539 – 552.
22. Day M. 1995. Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat, J Comp Pathol 112:79-96.
23. Dhaliwal R, Kitchell B. 2003. Canine lymphosarcoma: clinical features. Compendium 25: 572-580.
24. Dobson J, Blackwood L, McInnes E. 2001. Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. J Small Anim Pract 42:377-384
25. Donald McGavin; Zachary J. 2007. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ta Ed. USA: Mosby
26. Duncan, J.R. 1993. The lymph nodes. En: Cowell y Tyler, eds. Diagnostic cytology of the dog and cat. 3ª ed. USA: Elsevier p. 93 -98.
27. Figuera R, Souza T, Barros C. 2002. Linfossarcoma em cães. Ciência Rural Vol. 32, n. 5. p. 895 – 899.

28. Fisher D, Naydan D, Werner L. 1997. Immunophenotyping lymphomas in dogs: a comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples, *Vet Clin Pathol* 26:66-69.
29. Fournel – Fleury C, Magnol J, Bricaire P, Marchal T, Chabanne L. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non Hodgkins lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117: 35-59.
30. Fournel-Fleury C, Magnol J, Bricaire P. 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non Hodgking lymphomas, *J Comp Pathol* 117:35-59.
31. Fournel-Fleury C, Ponce F, Felman P. 2002. Canine T cell lymphomas: a morphological, immunological and clinical study of 46 new cases, *Vet Pathol* 39:92-109.
32. Frizzera G, Wu D, Inghirami G. 1999. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol* 111 (Suppl. 1): S13-S39.
33. Gavazza A, Presciuttini S, Barale R. 2001. Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners, *J Vet Intern Med* 15: 190-195.
34. Gear R. 2009. Practical update on canine lymphoma. Classification and diagnosis. *In Practice* 31: 380-384.
35. Gentilina F, Calzolari C, Turbaa M. 2005. Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP)2 and 9 in lymphoma-affected dogs, *Leuk Res* 29: 1263-1269.
36. Gerger B, Hauser B, Reusch C. 2004. Serum levels of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol in dogs with hypercalcemia, *Vet Res Commun* 28: 669-680.

37. Greenlee P, Filippa D, Quimby F. 1990. Lymphoma in dogs: a morphologic, immunologic, and clinical study, *Cancer* 66: 480-490.
38. Grindem C, Breitschwadt E, Corbett W. 1994. Thrombocytopenia associated with neoplasia in dogs, *J Vet Intern Med* 8:400-405.
39. Guija de Arespacochaga A, Schwendenwein I, Weissenboeck H. 2007. Retrospective study of 82 cases of canine lymphoma in Austria based on the Working Formulation and immunophenotyping. *J. Comp. Pathol.* 136, 186-192.
40. Harris N, Jaffe E, Stein H. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-1392.
41. Harris NL. Diagnosis and classification of lymphomas. En: Colvin RB, BhanAK, McKluskey RT. 1995. *Diagnostic Immunopathology*. New York: Raven Press, 501-534
42. Harris NL, Jaffe, ES. 1997. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia. *Histopathology* 36, 69–89
43. Hahn K, Freeman K, Barnhill M. 1999. Serum alpha 1 – acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treatments with doxorubicin, *J Am Vet Med Assoc* 214:1023-1025
44. Jain W. 1986. The Leukemia complex. In Schalm's veterinary hematology, ed 4, Philadelphia: Lea & Febiger.
45. Jemal A, Tiwari R, Murray T. 2004. Cancer statistic: 2004, *CA Cancer J Clin* 54:8-29.
46. Kaeene J, Miller R. 1999. Re-analysis of 2,4-D use and the occurrence of canine malignant lymphoma, *Vet Hum Toxicol* 41: 164-170

47. Kaiser H, Animal neoplasms. 1981. A systemic review. En Kaiser He. eds. Neoplasms: comparative pathology in animals, plants and man. Baltimore: William & Wilkins.
48. Keller E, MacEwen E, Rosenthal R. 1993. Evaluation of prognosis factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma, J Vet Intern Med 7:289-295.
49. Keller S, Keller B, Grest P, Börger T, Güscetti F. 2007. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine mylphomas. Vet. Diagn. Invest. 19:652-659.
50. Kelsey JL, Moore AS, Glickman LT. 1998. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. Epidemiol Rev 20: 204-217.
51. Kiupel M, Bostock D, Bergmann V. 1998. The prognostic significance of AgNOR counts and PCNA-positive cell counts in canine malignant lymphomas, J Comp Pathol 119:407-418.
52. Kiupel M, Teske E, Bostock D. 1999. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. Vet Pathol; 36: 292-300.
53. Krohne S, Vestre W, Richardson R. 1987. Ocular involvement in canine lymphosarcoma: a retrospective study of 94 cases, Am College Vet Ophth, Proc. 68-84.
54. Kruiningen, HJ. Sistema gastrointestinal. 1998. En: Carlton W, McGavin MD, Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2 ed. Porto Alegre: ArteMed, p. 13 – 94.
55. Larue S, Fo M, Ogilvie G. 1999. Tumor cell kinetics as predictors of response in canine lymphoma treated with chemotherapy alone or combined with whole body hyperthermia. Int J Hyperthermia 15: 475-486.

56. Laurent A. Classification of Malignant Lymphoma in Domestic Animals. 2001. History and Conceptual Evolution. European Journal of Veterinary Pathology. Vol. 7 No. 2.
57. Leib M, Bradley R. 1987. Alimentary lymphosarcoma in a dog. Comp Pract Vet Cont Ed 9:809-815.
58. Lennert K, Feller A. 1990. Histopathology of non Hodking lymphoma (based on the update Kiel classification), 2^a ed. Berlín: Springer-Verlag.
59. Levine A. 1994. Lymphoma complicating immuno deficiency disorders. Ann Oncol 5:29-36.
60. Lieberman P, Filippa D, Straus D. 1986. Evaluation of malignant lymphomas using three classifications and the working formulation; 482 cases with median follow-up of 11. Years, Am J Med 81:365-380.
61. Lindblad – Toh K, Wade C, Mikkelsen T. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structura of the domestic dog, Nature 438:803-819.
62. Mayr B, Holzheu M, Schaffner G. 2003. N-ras mutation in a canine lymphoma: short communiacion. Acta Vet Hung 51:91-94.
63. MacEwenE, Brown N, Patnaik A. 1981. Cyclic combination chemotherapy of canine lymphosarcoma, J Am Vet Med Assoc 178:1178-1181.
64. MacEwen E, Patnaik A, Wilkins R: Diaagnosis and treatment of canine hematopoietic neoplasms, Vet Clin North AAm Smaall Anim Pract 7:105-118, 1977
65. Maclachlan NJ, Cullen J. Fígado, Sistema biliar e pâncreas exócrino. En: Carlton W, McGavin M. D. Patologia Veterinária Especial de Thomson. 2ed. Porto Alegre: Artemed, 1998. p. 95 – 131.
66. Madewell B. 1986. Hematological an d bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma, J Am Anim Hosp Assoc 22:235-240.

67. Madewell B, Theillen G. 1987. Hematopoietic neoplasms, sarcoma and related conditions. En: Febinger L. Veterinary Cancer Medicine. 2^a ed. Philadelphia p. 392 – 407.
68. Massa K, Gilger B, Miller T. 2002. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). Vet Ophthalmol 5:9-98.
69. Meuten JD. 2002. Tumors in domestic animals. 4^a ed. USA: Iowa State Press
70. Modiano J, Breen M, Burnett R. 2005. Distinct B cell and T cell lymphoproliferative disease prevalence among dog breeds indicates heritable risk, Cancer Res 65:5654-5661.
71. Moore P, Olivry T, Naydan D. 1994. Canine cutaneous epitheliotrophic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD+8 T cells, Am J Pathol 144: 421-429.
72. Moore A, Leveille C, Reimann K. 1995. The expression of P – glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance, Cancer Invest 13:475-47.
73. Moreno-Ramirez A, Herrera A. 2003. Diagnóstico y tratamiento de los linfomas cutáneos primarios de células T. Med Cutan Iber Lat Am 31(2): 75-100
74. Morris J; Dobson J. 2001. Small Animal Oncology. 5^a ed. Usa: Blackwell science
75. Moulton JE, Harvey JW. 1978. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues in Tumor in domestic animals. 1^a ed. USA: California
76. Moulton J, Harvey J: Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue. In Moulton J, editor: Tumors of domestic animals. Ed. 3, Berkeley, Calif 1990. University of California Press
77. National Cancer Institute. 1982. Sponsored study of classification of non Hodgking lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage.

The Non Hodking Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49:2112-2135.

78. Nasir L, Devlin P, McKevitt T. 2001. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues, Neoplasia 3:351-359.
79. Nathwani B, Brynes R, Lincoln T. 1992. Classifications of non Hodking lymphomas. In Knowles D, ed: Neoplastic hematopathology, Baltimore: Williams & Wilkins.
80. Nyland T, Park R. 1983. Hepatic ultrasonography in the dog. Vet Radiol 24:74-84.
81. Oberling, C. 1928. Les reticulosarcomes et les reticulo-endotheliosarcomes de la moelle osseuse (sarcome d'Ewing). Bull. Assoc. Fr. Et. Cancer, 17 : 259-296.
82. Ogilvie GK, Moore A. 1995. A practice manual: Managing the Veterinary Cancer Patient. 1^a ed. New Jersey: triton. p. 542.
83. Ogilvie G, Moore A. 1995. Tumors of Canine Spine, Managing the Veterinary Cancer patient. Veterinary Learning Systems Company. INC: 299-300.
84. Onions D. 1984. A retrospective survey of familial canine lymphosarcoma, J Natl Cancer Inst 72:09-912.
85. Oltersdorf T, Elmore S, Shoemaker A. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, Nature 435:677-681.
86. Padilla M. 2009. Clasificacion de los linfomas. pasado, presente y futuro. Rev Inst Med Su: LXXV(134)
87. Pappo A; Shapiro D; Crist W. 1997. Rhabdomyosarcoma: biology and treatment. Pediatric Clinics of Norton America; 44(4): 953-972
88. Parodi A, Wyers M, Paris J. 1968. Incidence of canine lymphoid leucosis: age, breed and sex distribution- results of necropsy survey, Bibl Haematol 30: 263.267.

89. Penn I. 1990. Cancers complicating organ transplantation. *N engl JMed* 323: 1767 – 1771.
90. Phillips B, Kass P, Naydan D. 2000. Apoptic and proliferation indexes in canine lymphoma, *J Vet Diagn Invest* 12:111-117.
91. Ponce F, Magnol J-P, Ledieu D. 2004. Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy, *Vet J* 167:158-166.
92. Priester W, McKay F. 1980. The occurrence of tumors in domestic animals, *National Cancer Institute Monogr* 54:1-210.
93. Rappaport H. 1996. Tumors of the hematopoietic system. In *Atlas of tumor pathology*, Washington D. Armed Forces Institute of Pathology
94. Raurell X, Laporta, D. Linfoma epidural. 1998. Un caso clínico. *Clinica Veterinaria de Pequeños animales (Avepa)* Vol. 18 n°2.
95. Rappaport, H. 1966. Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of tumor pathology*, Sect.3, Fasc.8. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C.
96. Reif J, Lower K, Ogilvie G. 1995. Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma, *Am J epidemiol* 141: 352-359.
97. Ridge L, Swinney G. 2004. Angiotrophic intravascular lymphosarcoma present – ing as hemothorax effusion in a dog, *Aust Vet J* 82: 616-618.
98. Robb-Smith. 1938. Reticulosis and reticulosarcoma. A histological classification. *J. Pathol. Bacteriol.*, 47 : 457-480
99. Robbins, Cotran, Kumar y Collins. 1999. *Patología Estructural y Funcional*. 6ª ed. Pennsylvania. USA: Saunders Elsevier
100. Romani A, Sant' ana FJ. 2005. Linfossarcoma multicêntrico em um cão relato de caso. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia. V.5. p. 223 – 225.

101. Rosciani, A, Koscinczuk, P. Diagnóstico citológico por punción con aguja fina de Linfoma No Hodgkin de tipo alimentario en un canino. Sesión de Comunicaciones Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNNE. 1994
102. Rosin A. 1982. Neurologic diseases associated with lymphosarcoma in ten dogs, J Am Vet Med Assoc 181: 50-53.
103. Roulet F. 1930. Das primäre Retothelsarkom der Lymphoknoten. Virchows Arch. Path. Anat. 277:15-47.
104. Ruslander D, Gebhard D, Tompkins M. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders, In Vivo 11:169-172.
105. Shadduck J, Reedy L, Lawton G. 1978. A canine cutaneous lymphoproliferative disease resembling mycosis fungoides in man. Vet Pathol 15:16-724.
106. Searcy, GP. Sistem hemopoético. En: Carlton W, McGavin M. 1998. Patología Veterinaria Especial de Thomson. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed. p. 305 – 352.
107. Skudder P, Schwartz S. 1985. Primary lymphoma of the gastrointestinal tract, Surg Gynecol Obstet 160:5-8.
108. Socorrás. 2002. Linfomas B y T. Diagnóstico inmunofenotípico de los linfomas no hodgkinianos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2002;19(1)
109. Sueiro R, Carlos A, Aparecido C, Aparecida P, Vassallo J. 2005. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. J Bras Patol Med Lab 41: 263-270.
110. Shih-Hung H, Philip J, Kozak J. 2012. Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. Virology, 2012; DOI:10.1016/j.virol.2012.02.013
111. Starrak G, Berry C, Page R. 1997. Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. Vet Radiol Ultrasound 38:411-418.

112. Strandstrom H, Rimaila-Parnanen E. 1979. Canine atypical malignant lymphoma. *Am J Vet Res* 40:1033-1034.
113. Swerdlow S, Campo E, Harris N. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4th). Lyon, France: IARC Press.
114. Teske E, Egberink H. 1994. Clustering in canine malignant lymphoma. *Vet Q* 16:134-136.
115. Teske E, Egberink K. 1993. Clustering of canine lymphoma in Non-Hodgkin lymphoma in the dog: characterization and experimental therapy. Tesis de Médico Veterinario. Universidad de Utrecht. 48 p.
116. Teske E, Van Heerde P, Rutteman G. 1994. Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 205:1722-1728.
117. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. 1997. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group. Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, Vol 89, No 11. p 3909-3918.
118. Thomas R, Smith K, Bould R. 2001. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers, *Chromosome Res* 9:649-657.
119. Tomley F, Armstrong S, Mahy B. 1983. Reverse transcriptase activity and particles of retroviral density in cultured canine lymphosarcoma supernatants. *Br J Cancer* 47:277-284.
120. Trigo, FJ. 1998. Patología Sistémica Veterinaria. 3ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
121. Vail D, Ogilvie G. 2003. Neoplasias Linfóides. En: Birchard, SJ.; Sherding, R. G. *Manual Saunders Clínica de Pequeños Animais*. 2 ed. São Paulo: Roca. p. 227 – 236.
122. Vail D, Young K. 2009. En: Withrow S. *Oncología Clínica de pequeños animales*. 4ed. España: Saunders Elsevier. p 685-711.

123. Van J.E, Gruys E.,Mouwens J.M., 2007. Color Atlas Veterinary Pathology. 2a edition. USA: Saunders Elsevier
124. Vail D, Kisseberth W, Obradovich J. 1996. Assessment of potential doubling time, argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNor), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non Hodgkin lymphoma, *Exp Hematol* 24:807-815.
125. Valli, W. Vernau, L.-P. de Lorimier, P. S. Graham and P. F. Moore. Canine Indolent Nodular Lymphoma. 2006. *Vet Pathol* 43: 241. DOI: 10.1354/vp.43-3-241
126. Valli V, Caswell J, Jacobs R, Parodi A. 2002. Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals, EWashington. Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization.
127. Valli V,Vernau W, De Lorimier L, Graham P, Moore P. 2006. Canine Indolent Nodular Lymphoma. *Vet Pathol* 2006 43: 241
128. Valli V. 2007. Veterinary comparative hematopathology. 5^a ed. USA: Blackwell Publishing.
129. Valli V, Caswell J, Ramos-Vara J. 2010. Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Vet Pathol* 48: 198.
130. Valli V, Kass P, San Myint M, Scott F. 2013. Canine Lymphomas : Association of Classification Type, Disease Stage, Tumor Subtype, Mitotic Rate, and Treatment With Survival. *Vet Pathol* 00(0)
131. Vela Casas F. Linfomas no-Hodgkin y enfermedad de Hodgkin *Pediatr Integral* 2004;VIII(6):475-486
132. Veldhoen N, Stewart J, Brown R. 1998. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53. *Oncogene*. Jan 15;16(2):249-55.

133. Vezzali E, Parodi A, Marcato P. 2009. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8, 1, 38–49.
134. Von Euler H, Einarsson R, Olsson U. 2004. Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease, *J Vet Intern Med* 18:595-56.
135. Weir E, Norrdin R, Matus R. 1988. Humoral hypercalcemia of malignancy in canine lymphosarcoma, *Endocrinology* 122: 602-608.
136. Weir E, Greele P, Matus R. 1988. Hypercalcemia in canine lymphosarcoma is associated with the T cell subtype and with secretion of a PTH-like factor *J bone Miner Res* 3:S106.
137. Weisenburger D. 1994. Epidemiology of non-Hodgkin lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic, *Ann Oncol* 5:519.
138. Weller R, Hoolmberg C, Theilen G. 1980. Histologic classification as a prognostic criterion for canine lymphosarcoma, *Am J Vet Res* 41: 1310-1314.
139. Weller R. 1985. Paraneoplastic disorders in the dog with hematopoietic tumors, *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15:805-816.
140. Weller R, Hoffman W. 1992. Renal function in dogs with lymphosarcoma and associated hypercalcemia, *J Small Anim Pract* 33:61-66.
141. Wellman, ML. Neoplasia hematopoética e linfóide. 1996. En: Bojrab, M.J. *Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais*. 2ª ed. São Paulo: Manole. p.737 – 749
142. Whang-Peng J, Knutsen T, Jaffe E. 1995. Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin lymphoma: clinical correlations with cytogenetics, histologic, immunophenotyping and molecular studies. *Blood* 85: 203 – 216.

143. Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106: 179-196.
144. Winkler S, Murua EH, Reimann-Berg N, Bullerdiek J, Nolte I. 2005. Cytogenetic investigations in four canine lymphomas. *Antican Res* 25:3995-3998.
145. Yazawa M, Okuda M, Kanaya N. 2003. Molecular cloning of the canine telomerase reverse transcriptase gene and its expression in neoplastic and nonneoplastic cells, *Am J Vet Res* 64: 1395-1400.
146. Yunis J, Oken M, theologides A. 1984. Recurrent chromosomal defects found in most patients with non Hodking lymphoma, *Cancer genet Cytogenet* 13, 17-28.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez F, Aburto E, Aristi G, Chávez G. 2009. Estudio histológico e inmunofenotípico de linfoma canino en el centro de México. Vet. Mex. 40:141-155.
2. Allen SW, Prasse KW. 1986. Cytologic Diagnosis of Neoplasia and Perioperative Implementation. The Compendium on Continuing Education. 8 (2): 72 - 78.
3. Balagué O, Colomo L, Campo E. 2004. Linfoma de células del manto. Rev Esp Patol Vol 37, n.º 2: 159-172
4. Baskin C, Couto C, Wittum T. 2000. Factors Influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study. J Am Anim Hosp Assoc; 36: 404-409.
5. Baskin G, Couto C, Wittum T. 2000. Factors influencing first remission and survival in 145 dogs with lymphoma: a retrospective study, J Am Anim Hosp Assoc 36:404-409.